

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

**UNTERSUCHUNGEN ZUM IONENTRANSPORT
KULTIVierter CORNEAENDOTHELZELLEN VOM
RIND MIT HILFE VON MIKROELEKTRODEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas J. Jentsch
aus Berlin

~~1000~~
10. 12.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0016

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

**UNTERSUCHUNGEN ZUM IONENTRANSPORT
KULTIVierter CORNEAENDOTHELZELLEN VOM
RIND MIT HILFE VON MIKROELEKTRODEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas J. Jentsch
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. M. Wiederholt

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Wollensak

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 2. März 1984

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	3
<u>2. Material und Methoden</u>	5
2.1 Zellkultur	5
2.2 Lösungen	6
2.3 Bezugsquellen der Chemikalien	8
2.4 Experimentelle Anordnung	9
2.5 Bestimmung der Diffusionspotentiale	13
<u>3. Resultate</u>	13
3.1 Intrazelluläre Potentiale	13
3.2 Einfluß von Bikarbonat und CO_2 auf das intrazelluläre Potential	14
3.2.1 Entzug von Bikarbonat/ CO_2	14
3.2.2 Differenzierung der Effekte von Bikarbonat und pCO_2	17
3.3 Einfluß von Bikarbonat auf die Kaliumleitfähigkeit	20
3.4 Einfluß des intrazellulären pH	22
3.5 Einfluß des extrazellulären pH	26
3.6 Einfluß von Inhibitoren der Karboanhydrase und des Anionentransportes auf die Bikarbonat- und pH-Reaktion	28
3.7 Kationenabhängigkeit der Bikarbonatreaktion	31
3.8 Einfluß von Natriumentzug auf V	33
3.8.1 Einfluß von Bikarbonat auf die Natriumreaktion	36
3.8.2 Einfluß von Inhibitoren des Anionentransportes auf die Natriumreaktion	38
3.9 Quantitativer Vergleich der Potentialänderungen unter Natrium- und Bikarbonatvariation	39
3.10 Wird Lithium ebenfalls transportiert?	42
3.11 Einfluß von Amilorid auf das Ruhepotential und die Reaktion auf Na und HCO_3^-	44
3.12 Einfluß von Ouabain	48
<u>4. Diskussion</u>	50
4.1 Übertragbarkeit auf die <i>in vivo</i> Situation	50

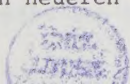
4.2 Intrazelluläre Potentiale	52
4.3 Lokalisation der Membranprozesse	55
4.4 Einfluß von Bikarbonat, CO_2 und pH auf das Membranpotential	56
4.4.1 Beeinflussung der Kaliumleitfähigkeit durch Bikarbonat	56
4.4.2 Hinweise auf einen elektrogenen Bikarbonattransport	58
4.4.3 Der Einfluß von Methazolamid und Stilben- derivaten auf die Bikarbonat- und pH-Reaktion	60
4.5 Modell: Gekoppelter elektrogener Transport von Natrium und Bikarbonat	63
4.5.1 Kationenabhängigkeit der Bikarbonatreaktion	65
4.5.2 Möglicher Lithium-Bikarbonat-Cotransport	67
4.5.3 Stöchiometrie des Cotransportes	68
4.6 Einfluß von Amilorid	69
4.7 Einfluß von Ouabain	72
4.8 Modell für den transendothelialen Transport in der Cornea	73
4.9 Vergleich mit anderen HCO_3^- - oder H^+ - transportierenden Systemen	76
<u>5. Zusammenfassung</u>	80
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	85

1. Einleitung

Die Rückseite der Cornea wird von einem einschichtigen Plattenepithel, dem Corneaendothel, bedeckt. Eine wichtige Funktion des Endothels, das zur Klasse der undichten Epithelien gehört, ist der Transport von Wasser aus dem Stroma der Cornea in die vordere Augenkammer. Durch diesen Transport wird die Durchsichtigkeit der Cornea aufrechterhalten, die anderenfalls schwellen und eintrüben würde.

Zur Aufklärung der Transportprozesse über das Corneaendothel (vorwiegend vom Kaninchen) sind bisher eine Vielzahl transepithelialer Messungen durchgeführt worden. Es wurde ein Flüssigkeitstransport von ca. $5 \mu\text{l/h/cm}^2$ gefunden (20, 56), der von der Bikarbonat- und Natriumkonzentration der Lösung abhängig war und durch Karboanhydrasehemmer reduziert werden konnte (20). In modifizierten Ussing-Kammer Experimenten wurde eine transepitheliale Spannung V_{te} in der Größenordnung von 0.5 bis 1 mV, Kammerwasserseite negativ, und ein Kurzschlussstrom I_{sc} in der Größenordnung von $10\text{--}20 \mu\text{A/cm}^2$ festgestellt (20, 37, 38, 39, 98, 99). Sowohl V_{te} als auch I_{sc} waren abhängig von der extrazellulären Bikarbonat- (37, 20, 38, 98, 99) und Natriumkonzentration (37, 20) und konnten durch Inhibitoren der Carboanhydrase reduziert werden (20, 38). Die Aktivität dieses Enzyms wurde histochemisch in diesen Zellen nachgewiesen (38, 63, 65). Fluxmessungen mit radioaktiven Isotopen ergaben einen transepithelialen Transport von Bikarbonat aus dem Stroma in das Kammerwasser (31, 42, 51). Dieser Transport war abhängig von der Natriumkonzentration (31). Während in früheren Arbeiten (38) kein Nettotransport von Natrium nachgewiesen werden konnte, beschreiben mehrere neuere Arbeiten (40, 62, 56, 57, 58) einen Natriumflux, der die gleiche Richtung und Größenordnung wie der Bikarbonattransport aufweist. Neuere Arbeiten beschreiben auch eine Reduzierung der transepithelialen Spannung V_{te} und des Wassertransports durch Amilorid (1mM) und SITS (1mM) (56).

Die oben erwähnten Studien wurden vorwiegend mit Kaninchencorneae durchgeführt. In neueren Arbeiten wurden ebenfalls



transepitheliale Messungen an Corneaendothelpräparaten des Menschen (39, 99) und des Rindes (98) durchgeführt. In beiden Fällen ergab sich eine Abhängigkeit von V_{te} und I_{sc} von der Bikarbonatkonzentration ähnlich der des Kaninchens. Dies lässt es wahrscheinlich erscheinen, daß die Transportmechanismen der Corneaendothelien dieser drei Spezies und möglicherweise auch anderer Säugetiere einander sehr ähnlich sind.

Die an dem Transport von Bikarbonat und Natrium beteiligten grundlegenden Membranprozesse sind noch nicht bekannt. Es wurden unter anderem die Beteiligung eines Natrium-Protonen-Gegen austauschs (20, 56) als auch einer HCO_3^- -ATPase diskutiert (77). Neuere Studien lassen es jedoch wahrscheinlich erscheinen, daß diese ATPase - ähnlich wie dies auch für die Niere beschrieben wurde - ausschliesslich in den Mitochondrien lokalisiert ist und sie daher keine direkte Rolle für den transepithelialen Transport spielen kann (78, 96).

Zur Aufklärung der grundlegenden Transportmechanismen stellen intrazelluläre Potentialmessungen eine sehr wichtige Ergänzung der transepithelialen Studien dar. Bisher liegt jedoch nur eine relativ geringe Anzahl dieser Messungen vor (97, 59, 60, 48). Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß es sehr schwierig ist, stabile Punktionen der kleinen und fragilen Endothelzellen zu erreichen. Die gemessenen Zellpotentiale waren nur über wenige Minuten 'stabil', so daß während der Punktion einer Zelle kein Lösungswechsel durchgeführt wurde.

In diesen Studien wurde der Einfluss erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration, von Ouabain, metabolischen Inhibitoren und der Temperatur untersucht. In keiner dieser Arbeiten wurde jedoch ein Lösungswechsel während der Punktion einer Zelle durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß es mit kultivierten Corneaendothelzellen vom Rind möglich ist, stabile intrazelluläre Spannungsmessungen über Zeiträume bis zu einigen Stunden durchzuführen. Dadurch wurde es erstmals möglich, an diesem Zelltyp mehrere aufeinanderfolgende Lösungswechsel während der Registrierung des Potentials einer einzigen Zelle

durchzuführen. Das Ziel der Arbeit besteht darin, die elementaren Transportschritte von Bikarbonat und Natrium näher zu bestimmen. Dazu wurden umfangreiche Veränderungen der Ionenzusammensetzung des extrazellulären Mediums vorgenommen und chemische Verbindungen zugesetzt, von denen aus anderen Untersuchungen bekannt ist, daß sie eine selektive Wirkung auf bestimmte Transportprozesse in der Plasmamembran ausüben. So ist es möglich, auch bei Messung nur eines Parameters - der Spannung über die Plasmamembran der Zelle - detaillierte Informationen über Transportmechanismen in der Zellmembran zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Primärkulturen von Rindercorneaendothelzellen wurden nach einer Methode angelegt, die der von MacCallum et al. (66) beschriebenen ähnelt. Rinderaugen von 2- bis 3-jährigen Jungstieren wurden von einem Schlachthof erhalten. Sie wurden sofort nach dem Tod der Tiere exzidiert und in eisgekühlter Ringerlösung in das Labor transportiert. Dort wurden die Augen kurz in einer Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin B (2.5 µg/ml) enthaltenden Ringerlösung gewaschen. Unter sauberen, aber unsterilen Bedingungen wurde die Cornea peripher in Limbusnähe mit einer Rasierklinge inzidiert, bis Kammerwasser hervortrat. Anschliessend wurde mit einer feinen Schere in die entstandene Perforation eingegangen und die Cornea kreisförmig ausgeschnitten. Danach wurde sie - mit dem Endothel nach oben gerichtet - in die Vertiefung eines Plastikbehälters gelegt, so daß sie ihre Krümmung beibehielt. In die so entstehende Vertiefung wurden wenige Tropfen einer Trypsin-EDTA-Lösung (0.05/0.02%) gegeben. Um eine Verunreinigung der Kultur mit aus dem Stroma der Cornea stammenden Fibrozyten zu vermeiden, wurde nur soviel Lösung hinzugegeben, daß ein unbenetzter Streifen von 1 bis 2 mm Breite bis zum Schnitttrand der Cornea freiblieb. Nach einer Inkubation von ca. 2h Dauer bei Zimmertemperatur (oder 10 - 20 min bei 37 °C im späteren Verlauf der Arbeit) in einer Laminar-Flow-Kammer

wurde die Zellsuspension mit einer sterilen Pipette entnommen, nachdem mit ihr vorher vorsichtig das Endothel zusätzlich mechanisch durch Reiben abgelöst wurde. Diese Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche aus Polystyrol (Falcon Plastics, Becton and Dickinson, Heidelberg) gegeben und Nährmedium zugesetzt. Dieses bestand aus DMEM-Medium (Dulbecco's Modifikation des Minimal Essential Mediums von EAGLE), dem 10% fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2.5 µg/ml Amphotericin B zugesetzt wurde. Amphotericin B wurde nur in der Primärkultur zugesetzt, da es Poren in die Plasmamembran induziert und somit die elektrophysiologischen Untersuchungen verfälschen könnte. Spätestens nach der ersten Passagierung wurde es fortgelassen.

Nachdem sich eine genügend grosse Anzahl von Zellkolonien auf dem Boden der Flasche ausgebildet hatte, wurden die Zellen durch Trypsinierung (0.05% Trypsin, 0.02% EDTA) vom Boden der Flasche abgelöst und danach in der gleichen Flasche weitergezogen, um ein schnelleres Wachstum durch Aufheben der Kontaktinhibition zu erreichen. Nach ungefähr 2- 3 Wochen war der Boden der Flasche mit einem konfluenten Monolayer von Zellen bedeckt. Dann wurde der Zellrasen erneut trypsiniert und auf Tochterflaschen und -schalen verteilt. Der Aufteilungsgrad (split ratio) betrug dabei 1:2 bis 1:4, um schlechtes Wachstum durch zu grosse Verdünnung der Zellen zu vermeiden. Während die Zelllinie in Flaschen fortgepflanzt wurde, wurden für die elektrophysiologischen Experimente die Zellen in Gewebekulturschalen angesiedelt. Für die Untersuchungen wurden nur frühe Passagen benutzt (1. bis 5.), um eine Veränderung der Eigenschaften der Zellen in der Kultur zu vermeiden.

2.2 Lösungen

Die Zusammensetzung der bei der Arbeit gebrauchten Lösungen ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Lösung 1, auch 'bikarbonatreiche' Lösung genannt, ist der Kontrollringer. Er besaß eine derartig hohe Bikarbonatkonzentration, da bei einigen Säugtieren das Kammerwasser ähnliche Konzentrationen aufweist (98). In den Lösungen, bei denen die Bikarbonatkonzentration

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen (Angaben in mmol/l)

n	Na ⁺	K ⁺	Li ⁺	Chol ⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ⁻⁻	HCO ₃ ⁻	But ⁻	Gly ⁻	Ba ⁺⁺	NH ₄ ⁺	HEPES
1	151	5	-	-	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
2	151	5	-	-	0.9	1.7	135	1	0.9	23	-	-	-	-	10
3	151	5	-	-	0.9	1.7	148	1	0.9	10	-	-	-	-	10
4	151	5	-	-	0.9	1.7	158	1	0.9	-	-	-	-	-	10
5	-	5	-	151	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
6	-	5	-	151	0.9	1.7	148	1	0.9	10	-	-	-	-	10
7	-	5	-	151	0.9	1.7	158	1	0.9	-	-	-	-	-	10
8	-	5	105	46	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
9	-	5	105	46	0.9	1.7	148	1	0.9	10	-	-	-	-	10
10	-	5	105	46	0.9	1.7	158	1	0.9	-	-	-	-	-	10
11	-	110	-	46	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
12	-	110	-	46	0.9	1.7	148	1	0.9	10	-	-	-	-	10
13	70	5	-	81	0.9	1.7	113	1	0.9	46	-	-	-	-	10
14	35	5	-	116	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
15	17	5	-	134	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
16	8	5	-	143	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
17	141	5	-	-	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	10	10
18	141	5	-	-	0.9	1.7	158	1	0.9	-	-	-	-	10	10
19	151	5	-	-	0.9	1.7	133	1	0.9	-	-	25	-	-	10
20	151	5	-	-	0.9	1.7	118	1	0.9	-	40	-	-	-	10
21	116	40	-	-	0.9	1.7	112	1	0.9	46	-	-	-	-	10
22	116	40	-	-	0.9	1.7	158	1	0.9	-	-	-	-	-	10
23	151	5	-	-	0.9	1.7	115	1	-	46	-	-	1	-	10
24	151	5	-	-	0.9	1.7	161	1	-	-	-	-	1	-	10
25	136	5	-	-	0.9	1.7	143	1	0.9	-	-	-	-	-	40

(Chol⁺:= Cholin⁺, But⁻:= Butyrat⁻, Gly⁻:= Glycodiazin⁻, HEPES:=

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)

Alle Lösungen enthielten außerdem 5 mM Glucose

variiert wurde, wurde es durch gleiche Mengen Chlorid ersetzt. In Experimenten, in denen die Puffer Butyrat und Glycodiazin benutzt wurden, ersetzten die Natriumsalze dieser Säuren gleiche Mengen an NaCl. In Experimenten mit Ammoniumchlorid er-

setzte NH_4^+ entsprechende Mengen Na^+ . Da Barium mit Sulfat schlecht lösliche Salze bildet, enthielten bariumhaltige Lösungen ebenso wie die entsprechenden Kontrollösungen kein Sulfat. Bei natriumfreien Lösungen wurde Bikarbonat als Cholinbikarbonat zugegeben. Lösungen, die Lithium als hauptsächliches Kation enthielten, wurden daher mit konstanter Menge an Cholin (46 mM) hergestellt, um bei Änderung der Bikarbonatkonzentration in Lithiumringer nicht gleichzeitig die Cholin- und Li-Konzentration zu ändern.

Der pH der Lösungen wurde zunächst ohne Bikarbonat, aber mit Zugabe aller anderen Substanzen (inklusive der Inhibitoren) so eingestellt, daß bei Zugabe von 46 mM Bikarbonat unter Begasung mit 5% CO_2 sich ein pH-Wert von 7.66 ergab. Die bikarbonatfreien Lösungen wurden auf pH 7.5 titriert. Der pH-Wert der fertigen Lösungen ergab sich je nach Begasung und Bikarbonatkonzentration zu:

	46 mM HCO_3^-	23mM HCO_3^-	10mM HCO_3^-
Luft	7.66	7.9	7.5
5% CO_2 /Luft	7.66	7.4	7.0

Da die Stilbenderivate SITS und DIDS lichtsensitiv sind (cis-trans-Isomerisation der Stilbene (67)), wurden sie erst kurz vor Versuchsbeginn den Lösungen zugesetzt, die entsprechenden Spritzen vor Licht geschützt und die Experimente in gedämpften Licht durchgeführt.

2.3 Bezugsquellen der Chemikalien

SITS (4-acetoamido-4'-isothiocyanostilben-disulfonsäure) wurde von SERVA (Heidelberg) erworben, DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonsäure) von SIGMA (München). Glycodiazine (Redul^R) wurde von Schering AG (Berlin) zur Verfügung gestellt und Methazolamid (Neptazane^R) von Cyanamid/Lederle (München). Ouabain wurde von Merck (Darmstadt) gekauft, Amilorid von Sharp und Dohme (München), und Bis(2-hydroxyethyl)dimethylammoniumchlorid von Eastman (Rochester, N.Y., USA). Die Medien und Zusatzlösungen für die Zellkultur wurden entwe-

der von Seromed, München, oder Biochrom KG, Berlin, oder von Flow Laboratories, Meckenheim, bezogen.

2.4 Experimentelle Anordnung

Die experimentelle Anordnung ist schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben. Zur Punktion wird die Gewebekulturschale (a), auf deren Boden sich der Zellrasen befindet, in eine passende Aussparung eines Plexiglasbehälters (b) eingesetzt. Dieser Behälter besitzt eine untere Kammer (d), die kontinuierlich mit warmem Wasser geregelter Temperatur durchspült wird. Diese Kammer ist durch eine dünne Plexiglasscheibe elektrisch isolierend von dem oberen Behälter abgegrenzt, der ebenfalls mit Wasser (c) gefüllt ist. Dieses Wasser wird durch den unteren Behälter aufgeheizt und ist in Berührung mit dem Boden der eingelegten Gewebekulturschale. Auf den Boden dieser Schale wird mit Spiralfedern (nicht eingezeichnet) eine Flußkammer aus Plexiglas (e) fest aufgespreßt. Sie isoliert in ihrer Mitte einen Kanal dicht von dem Rest der Gewebekulturschale. Die Zellen, die auf dem Boden der Schale in diesem Kanal wachsen, können so schnell mit verschiedenen Testlösungen gespült werden. Die acht Einlässe (f) für die Lösungen befinden sich an dem einen Ende des Kanals, während die Flüssigkeit an dem anderen Ende mit Hilfe eines Hebers (g) aus Polyäthylenschlauch abgesaugt wird. Dieser Heber taucht in einen zweiten Behälter, der zu Anfang des Experiments mit 150 mM NaCl-Lösung gefüllt wird. Die in ihm stehende Flüssigkeit besitzt ein konstantes Niveau, da sie über einen speziell konstruierten Ablauf, der keine Höhenschwankungen durch tropfenden Abfluss erzeugt, in ein Glas für gebrauchte Lösung abfließen kann. Gleichzeitig wird über diesen Behälter die die Zellen umspülende Flüssigkeit geerdet. Dies geschieht über eine mit KCl gefüllte Agarbrücke (i), die in eine abgetrennte Kammer (j) des Behälters taucht. In dieser befindet sich 0.5 M KCl, in der eine mit der Erde verbundene Ag/AgCl Elektrode steckt. Die Lösungen werden vor dem Experiment gründlich begast und sofort danach in gasdichte Glasspritzen eingefüllt. Ein (oder zwei parallel geschaltete) Spritzenautomat (Braun, Melsungen) sorgt

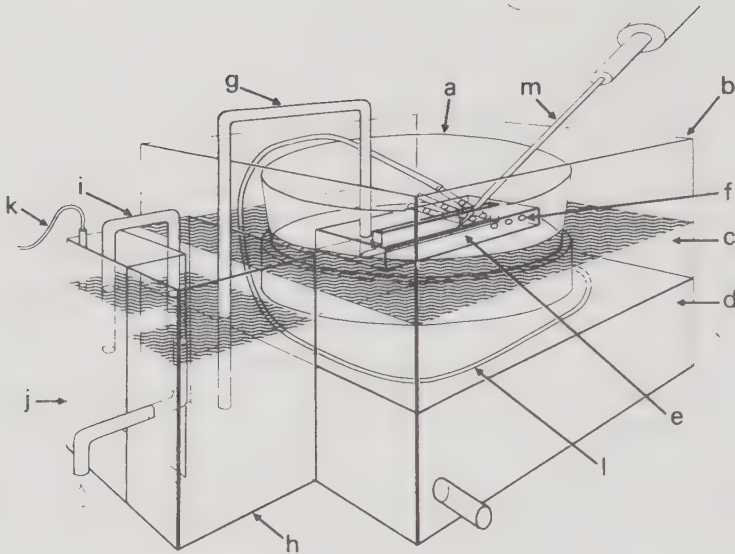


Bild 1: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung (a) Gewebekulturschale, (b) Wärmekammer, (c) temperaturreguliertes Wasser, (d) untere Abteilung zur Durchspülung mit warmen Wasser, (e) Flusskammer, (f) Einlässe für Testlösungen, (g) Heber, (h) Überlaufgefäß, (i) Agarbrücke, (j) Kammer mit 0.5 M KCl, (k) Erdungselektrode, (l) Schlauch für Testlösung, (m) Mikroelektrode

für den kontinuierlichen Vorschub der Lösungen mit einstellbarer Geschwindigkeit. Um Veränderungen der Gaszusammensetzung der Lösungen auf dem Weg zur Kammer zu vermeiden, bestehen die benutzten Schläuche aus gasundurchlässigem Material (Tygon^R, type R-3603, Norton Plastics, USA)). In diese Schläuche wurden zusätzlich feinere, gasdurchlässige Schläuche (Silastic^R, type 602-135, Dow Corning, Midland, Mich., USA) eingezogen, die während des Experiments aus Gasflaschen durchspült werden. Die Einlässe für diese inneren Schläuche befinden sich lediglich 2 cm vor dem Eintritt in die Flusskammer, so daß eine exakte Kontrolle des Gasdruckes und damit des pH-Wertes (bei

Bikarbonat/ CO_2 -Puffer) gewährleistet ist. Vor Eintritt in die Kammer laufen die Flüssigkeiten über Ventile, die sie entweder zur Flusskammer oder in Überlaufgefäße leiten. In der Kammer werden die Schläuche (1) erst in 3 Windungen durch das erhitze Wasserbad geleitet, um die Lösung auf die richtige Temperatur zu bringen. Da die Durchlaufzeit bei der benutzten Länge der Schläuche nicht zur völligen thermischen Äquilibration ausreicht, wird die Temperatur des Bades geringfügig höher als die an den Zellen zu erzielende Temperatur eingestellt. Letztere wurde während der Perfusion gemessen und die Badtemperatur entsprechend einreguliert. Die Temperatur in dem Kanal betrug $32 \pm 1^\circ\text{C}$, da dies der Temperatur der Cornea *in vivo* entspricht (21).

Da die Geschwindigkeit des Lösungswechsels an den Zellen sowohl durch die Vorschubgeschwindigkeit der Spritzen als auch durch den Flußquerschnitt des Kanals bestimmt wird, hat die Höhe des Flüssigkeitsspiegels in dem Kanal einen entscheidenden Einfluss auf die Schnelligkeit des Badwechsels. Die Höhe dieses Flüssigkeitsspiegels kann durch die Höhe des Überlaufgefäßes reguliert werden. Dazu wurde dieses auf die Plattform eines Manipulators gestellt, mit dem sie kontinuierlich in ihrer Höhe eingestellt werden kann. Während der Arbeit wurden meist Vorschubgeschwindigkeiten von 22 bis 45 ml/h gewählt. Bei der eingestellten Flüssigkeitshöhe im Kanal von ca. 0.5- 1 mm betrug die Geschwindigkeit des Badwechsels (90% Austausch) ca. 2-4 Sekunden. Dies wurde aus der Reaktion von Zellen auf Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration geschlossen.

Die Punktion der Zellen erfolgt mit konventionellen Ling-Geard Mikroelektroden. Sie wurden mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (Narishige Modell PD-5, Tokyo, Japan) aus Borosilikatglass (äusserer Durchmesser: 1.0 mm, innerer Durchmesser: 0.58 mm, Hilgenberg, Malsfeld) mit eingeschmolzenem Filament gezogen. Sie wurden mit 0.5 M KCl gefüllt und hatten - in Ringerlösung gemessen - Widerstände im Bereich von 70 bis 140 MOhm. Zur Aufnahme der Elektroden dient ein Elektrodenhalter mit eingebauter Ag/AgCl-Elektrode, der in die

Buchse eines Vorverstärkers eingesteckt wird. Der Elektrometerverstärker (WPI M4-A, New Haven, Conn., USA) verstärkt das Signal mit einem Faktor 1. Die Spannung wird an einem Digitalvoltmeter abgelesen und ihr Verlauf auf einem Schreiber (Rikadenki, Tokyo, Japan) registriert. Der Vorverstärker mit eingesteckter Elektrode ist seinerseits an einem Gerät zum schnellen Vorschieben der Elektroden ('Stepper') befestigt. Der Stepper erzielt eine schnelle Beschleunigung der Elektrode über kurze Distanzen, mit der sich die Ausbeute an stabilen Zellpunktionen erheblich verbessern lässt. Während der Arbeit wurde ein hydraulischer Stepper (David Kopf Instruments 607 W, Tujunga, Cal., USA, Vorschub $1\text{ }\mu\text{m}$) als auch ein Stepper mit Schrittmotor ('Heidelberg Nanostepper', Science Trading, Frankfurt, variabler Vorschub) benutzt. Der Vorschubteil des Steppers ist auf einem Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) befestigt. Mit diesem wird die Elektrode vorsichtig unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Mikroskops in einem flachen Winkel (ca. 20°) abgesenkt, bis sie gerade den Boden der Schale erreichte. Häufig wird dabei eine Zelle punktiert. Im allgemeinen ist es jedoch erforderlich, die Elektrode weiter auf dem Boden der Plastikschaale voranzuschieben um neue Zellen zu punktieren. Zur Erleichterung dieser Arbeit wurde eine spezielle Elektronik aufgebaut ('cell finder'), die automatisch die Elektrode solange in wählbaren Schritten vorschiebt, bis eine Zelle punktiert ist. Dies wird über das vom Verstärker gemessene elektrische Signal erkannt, das dazu einen bestimmten, einstellbaren Schwellenwert unterschreiten muß. Gleichzeitig wird ein Analogsignal ausgegeben und auf dem Schreiber registriert, das der Anzahl der durchgeführten Vorschubschritte proportional ist.

Die Punktionsanordnung befindet sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faradaykäfigs, der zur elektrischen Abschirmung dient. Um eingekoppelte niederfrequente elektrische Störungen ('Brummen') zu verringern, sind die Spritzenautomaten dicht am Faradaykäfig aufgebaut, so daß der längste Teil der Schläuche innerhalb des Käfigs verläuft. Die untere Abteilung (d) des Wärmebades wurde ebenfalls geerdet.

2.5 Bestimmung der Diffusionspotentiale

Bei der oben beschriebenen experimentellen Anordnung können aufgrund verschiedener Ionenbeweglichkeiten zwischen verschiedenen Lösungen Diffusionspotentiale (Liquid junction potentials, LJP) (3, 54) auftreten. Diese müssen bei der Auswertung der Spannungsmessungen berücksichtigt werden, um die 'wahre' Spannung über der Plasmamembran zu erhalten. Da die Diffusionspotentiale für die hier vorliegenden komplexen Verhältnisse theoretisch nicht genau beschrieben werden können, wurden sie experimentell bestimmt. Dazu wurde die gleiche experimentelle Anordnung benutzt, jedoch an Stelle einer Mikroelektrode ein chlorierter Silberdraht (1 mm Durchmesser) auf den Boden des Kanals abgesenkt. Lösungswechsel in dem Kanal wurden unter denselben Bedingungen wie bei den Punktionsexperimenten durchgeführt und die gemessenen Spannungen registriert. Da die Spannung über die Grenzfläche der Ag/AgCl-Elektrode zur wässrigen Lösung von deren Cl-Aktivität bestimmt wird, wurden die Ergebnisse für Lösungen verschiedener Chloridkonzentrationen korrigiert. Dabei wurde ein ideales NERNSTsches Verhalten der Elektrodenantwort angenommen. Die Messungen mit drei verschiedenen Ag/AgCl Elektroden ergaben folgende Diffusionspotentiale bei dem Umschalten von Kontrollringer (Lös. 1) auf die angegebenen Lösungen (Angaben in mV $\pm$ SD): Lös. 2: +1.3 $\pm$ 0.5, Lös. 5: +2.4 $\pm$ 0.2, Lös. 8: +5.5 $\pm$ 0.3, Lös. 13: +1.7 $\pm$ 0.4, Lös. 14: +2.3 $\pm$ 0.3, Lös. 15: +2.6 $\pm$ 0.2, und Lös. 16: +2.8 $\pm$ 0.2.

3. Resultate

3.1 Intrazelluläre Potentiale

Das Herabsenken der Elektrode auf den Boden der Kulturschale führte in vielen Fällen bereits zur Punktion einer Zelle. Meistens mußte die Elektrode jedoch mit dem Stepper weiter auf dem Boden der Kulturschale vorgeschoben werden. Die Punktion einer Zelle äusserte sich in einem schnellen negativen Aufstrich der gemessenen Spannung. Danach brach sie entweder zusammen oder stieg langsam über einen Zeitraum von einigen Minuten bis zum Erreichen eines stabilen Wertes an. Dies lässt

sich vermutlich auf ein Abdichten der Elektrode in der Plasmamembran zurückführen. In einigen (selteneren) Fällen erreichte das Potential auch sofort seinen endgültigen Wert. Die stabilen Spannungen, die mit diesen beiden unterschiedlichen Verläufen gemessen wurden, stimmten gut überein.

In einigen Fällen wurden auch Potentialmessungen mit Elektroden durchgeführt, die mit 0.5 M NaCl statt mit 0.5 M KCl gefüllt waren. Auch hier ergaben sich ähnliche Spannungswerte. Daraus kann geschlossen werden, daß Kalium-Ionen, die durch Diffusion aus der Mikroelektrode in das Zytoplasma gelangen können, keinen nennenswerten Einfluss auf das gemessene Membranpotential haben. Brach das Potential einer Zelle zusammen, so konnte die Elektrode mit Hilfe des Steppers - auch automatisch - auf dem Boden der Kulturschale weiter fortgeschoben und somit neue Zellen punktiert werden. Dies konnte meist ohne erhebliche Änderung des Elektrodenwiderstandes, der durch Strominjektion gemessen wurde, durchgeführt werden. Dadurch war es möglich, ohne Elektrodenwechsel bequem mehrere (einige zehn bis hundert) Zellen hintereinander zu punktieren.

Die Häufigkeitsverteilung von gemessenen Membranspannungen V , die wenigstens 3 min stabil blieben, ist in Bild 2 dargestellt. Das Histogramm besitzt ein Maximum im Bereich von -40 bis -55 mV. Das arithmetische Mittel von V beträgt -46.3 ± 9 mV (SD, $n=262$).

3.2 Einfluß von Bikarbonat und CO_2 auf das intrazelluläre Potential

3.2.1 Entzug von Bikarbonat/ CO_2

Der Einfluß von Bikarbonat auf V wurde untersucht, indem der Kontrollringer (46 mM HCO_3^- , mit 5% CO_2 begast (Lös. 1)) durch einen nominell bikarbonatfreien Ringer (mit Luft begast, Lös. 4) ersetzt wurde. Ein typisches Experiment ist in Bild 3 dargestellt. Entzug von Bikarbonat führte zu einer schnellen Depolarisation der Zelle. Nach dem Durchlaufen eines Minimums stieg das Potential über einen Zeitraum von Minuten wieder an, erreichte jedoch nicht den Ausgangswert. Stattdessen blieb es

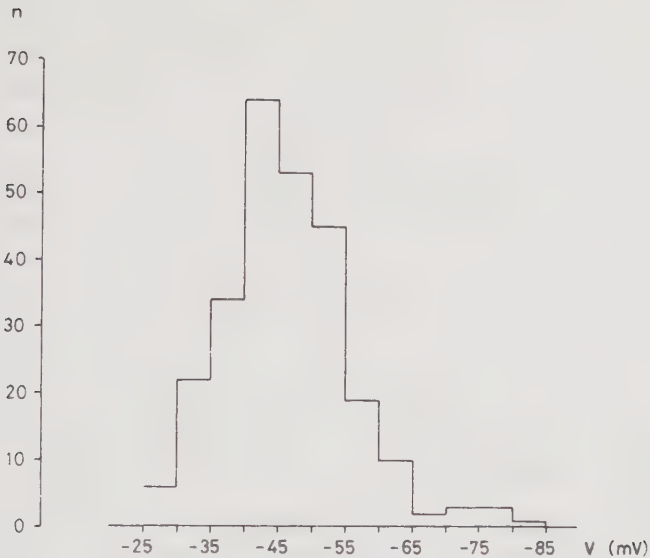


Bild 2: Häufigkeitsverteilung der in Kontrollringer (Lösung 1) gemessenen, mindestens über 3 min stabilen Membranspannungen V. Die Anzahl der Messungen beträgt 262, das arithmetische Mittel -46.3 ± 9 mV (SD).

um einige mV darunter, worauf in Bild 3 der Pfeil hinweist. Oft erreichten die Zellen im bikarbonatfreien Medium dieses Gleichgewichtspotential erst nach einer hyperpolarisierenden Oszillation (siehe z.B. Bild 7). Wiederzugabe von Bikarbonat führte zu einer raschen und ausgeprägten Hyperpolarisation, die oft das Ausmaß der Depolarisation nach Bikarbonatentzug weit überstieg. Das Ausmaß dieser Hyperpolarisation war abhängig von der Dauer der vorangegangenen Präinkubation in bikarbonatfreiem Medium. Dies ist auch in Bild 3 zu erkennen, wo nach der zweiten Exposition mit bikarbonatfreiem Ringer, deren Dauer (12 min) größer war als die erste (2 min), die Hyperpolarisation wesentlich zugenommen hatte. Dies läßt vermuten, daß die Spannungsänderungen durch transmembranale Bikarbonatfluxe erzeugt werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer in bikarbonatfreiem Medium sollte $[\text{HCO}_3^-]_i$ abnehmen, so daß bei der

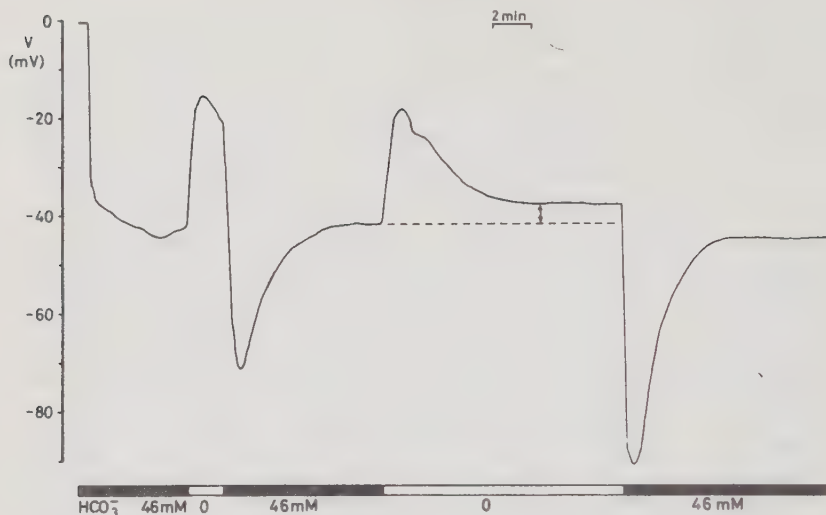


Bild 3: V bei Entzug von Bikarbonat/ CO_2 . Der Kontrollringer (Lös. 1) wurde zweimal durch nominell bikarbonatfreien Ringer (Lös. 4) ersetzt. Beachte: (a) Die Hyperpolarisation nach Wiederzugabe von Bikarbonat ist grösser im zweiten Fall, bei dem die vorangegangene Perfusionszeit mit bikarbonatfreier Lösung von 2 auf 12 min erhöht wurde, (b) nach Wechsel zu bikarbonatfreier Lösung ist V etwas geringer als in Kontrollringer. Dieser Unterschied ist durch den Pfeil angedeutet. Ähnliche Reaktionen wurden in über 30 Zellen beobachtet.

anschliessenden Wiederzugabe von HCO_3^- der Gradient für den Einstrom von Bikarbonat größer geworden ist. Dies könnte die beobachtete Zunahme der Hyperpolarisation erklären. In einigen Fällen stieg V auf über -100 mV. Nach dieser Hyperpolarisation benötigte V mehrere Minuten, um wieder einen konstanten Wert zu erreichen. Dabei wurden oft Schwingungen beobachtet.

Bei langsamen Flußgeschwindigkeiten (weniger als 1/4 der normalerweise benutzten Flußgeschwindigkeit) nahm das Ausmaß dieser Hyperpolarisation empfindlich mit der Geschwindigkeit des Lösungswechsels zu. Auch dies deutet darauf hin, daß V auf transmembranale Bikarbonatgradienten reagiert. Wird der Lö-

sungswechsel zu langsam vorgenommen, so steigt vermutlich die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration genügend schnell an, so daß die entstehenden Gradienten im Vergleich zum idealen sofortigen Lösungswechsel klein sind, wodurch die nur kleine Amplitude der Hyperpolarisation zu erklären wäre. Bei den normalerweise verwendeten Perfusionsgeschwindigkeiten hatten die Signale die Sättigung ihrer Amplituden erreicht.

Um auszuschliessen, daß die beobachteten Spannungsänderungen nicht eine Folge der veränderten Bikarbonatkonzentration, sondern vielmehr der dazu parallel gehenden Änderung der Chlorkonzentration waren, wurden auch einige Experimente durchgeführt, bei denen HCO_3^- durch SO_4^{--} ersetzt wurde (die Osmolarität wurde durch Mannit konstant gehalten). Dabei wurde kein Unterschied in der Reaktion auf Bikarbonat beobachtet.

3.2.2 Differenzierung der Effekte von Bikarbonat und pCO_2

In den im vorausgegangenen Abschnitt besprochenen Experimenten wurde die extrazelluläre Bikarbonatkonzentration gleichzeitig mit dem CO_2 -Partialdruck geändert, um den extrazellulären pH in einem vernünftigen Bereich zu halten. Dies kann aber zusätzliche Effekte hervorrufen, so daß in anderen Experimenten versucht wurde, die Einflüsse von Bikarbonat, CO_2 und pH auf voneinander abzugrenzen.

Ein derartiges Experiment ist in Bild 4 dargestellt. Es wurde die Reaktion einer einzelnen Zelle auf Änderung der Bikarbonatkonzentration in vier Stufen und des CO_2 -Druckes in zwei Stufen untersucht. Dabei wurden die Lösungen mit 10 und 23 mM HCO_3^- (Lös. 2,3) jeweils mit Luft oder mit Luft/5% CO_2 -Gemisch begast. Dies bewirkt gleichzeitig Änderungen des pH_o . (Siehe Tabelle auf Seite 8)

Das Experiment von Bild 4 besteht aus 3 Teilen. Zunächst (a) wurde $[\text{HCO}_3^-]_o$ gleichzeitig mit dem CO_2 -Partialdruck variiert. Darauf folgend (b) wurde $[\text{HCO}_3^-]_o$ bei konstantem pCO_2 (5%) variiert, und im letzten Schritt (c) wird der CO_2 -Druck bei konstanter Bikarbonatkonzentration (23 mM) geändert. Sowohl in Teil (a), in dem die Lösungen, die weniger Bikarbonat enthalten, mit Luft begast wurden, als auch in Teil (b),

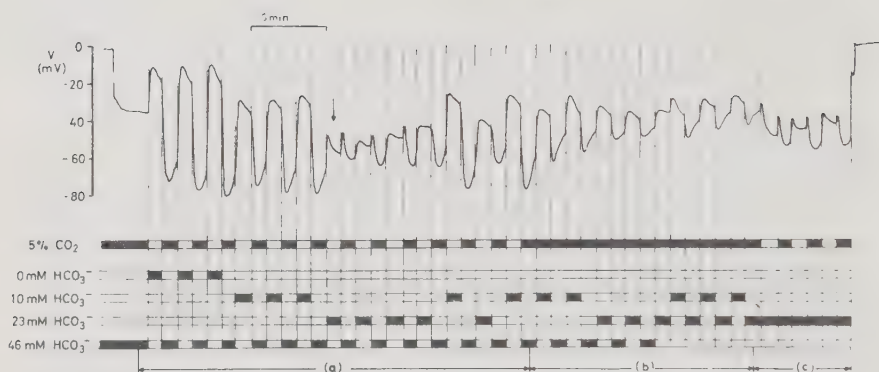


Bild 4: Einfluß der Bikarbonatkonzentration und des $p\text{CO}_2$ auf das Membranpotential V . Die Perfusionslösung wurde in regelmäßigen Abständen von einer Minute geändert. In Teil (a) wird $[\text{HCO}_3^-]$ zusammen mit $p\text{CO}_2$ variiert, in Teil (b) bei konstantem CO_2 -Druck (5%). Im letzten Teil (c) wird bei konstantem $[\text{HCO}_3^-]$ (23 mM) der CO_2 -Druck geändert. Es wurden acht derartige Experimente durchgeführt, die alle ähnliche Resultate lieferten.

wo der Wechsel bei konstantem Partialdruck von CO_2 durchgeführt wurde, hängen die Amplituden der Spannungsänderungen annähernd logarithmisch von $[\text{HCO}_3^-]_0$ ab. Dies ist aus Bild 5 ersichtlich, in dem die Mittelwerte dieser Spannungsänderungen aus mehreren Experimenten gegen den Logarithmus der Konzentrationsänderung aufgetragen sind. In Teil (a) betrug die Steilheit der Abhängigkeit 63.5 ± 4.5 (SEM, $n=9$) mV/Dekade, während sie in Teil (b) (bei konstantem $p\text{CO}_2$) lediglich 37.3 ± 3.1 (SEM, $n=8$) mV/Dekade betrug.

Dieser Unterschied lässt vermuten, daß neben Bikarbonat auch der CO_2 -Druck einen Einfluss auf das Membranpotential V besitzt. Dies wurde in Teil (c) des Experiments, in dem der Partialdruck von CO_2 bei konstanter Bikarbonatkonzentration

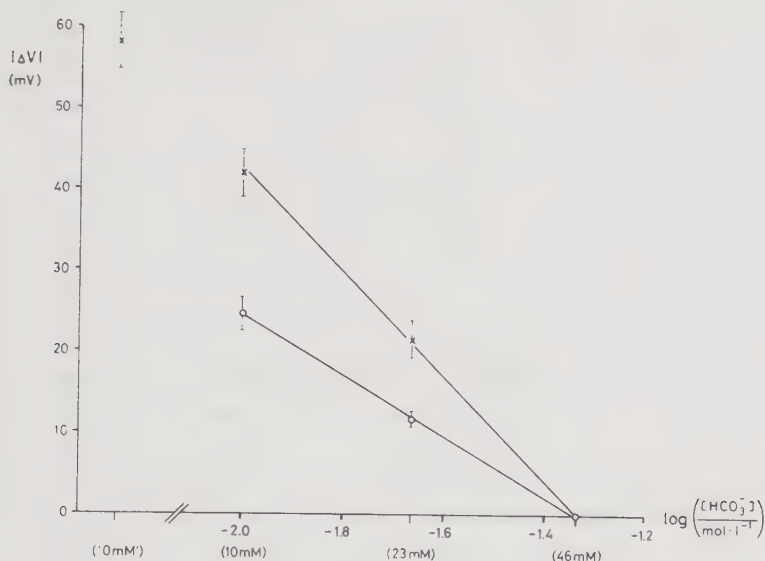


Bild 5: Abhängigkeit der Spannungsänderungen von der Grösse der Bikarbonatkonzentrationsänderung. Wie im Experiment aus Bild 4 wurde die Bikarbonatkonzentration in 1-minütigen Abständen von 46 mM (begast mit 5% CO_2 , Lös. 1) auf geringere Konzentrationen gebracht (Lös. 2,3). Die dadurch hervorgerufenen Spannungsänderungen V sind als Funktion des Logarithmus der beim nach dem Sprung erreichten Bikarbonatkonzentration dargestellt. Konzentrationsänderungen bei konstantem $p\text{CO}_2$ (5%) sind durch Kreuze (x) markiert, solche, bei denen gleichzeitig der CO_2 -Druck vermindert wurde, durch Kreuze (x). Jeder Punkt stellt das arithmetische Mittel von 7 bis 9 Messungen dar. Die Fehlerbalken geben SEM wieder. Die berechneten Steigungen der Kurven betragen 37.3 ± 3.1 mV/Dekade bei konstantem $p\text{CO}_2$ und 63.5 ± 4.5 mV/Dekade bei variiertem $p\text{CO}_2$ (Ohne Berücksichtigung von Diffusionspotentialen. Fehlerangaben in SEM). Lösungswechsel zwischen Lösung 1 (46 mM HCO_3^- / 5% CO_2) und Lösung 4 (nominal bikarbonatfrei, luftbegast) ergaben Spannungsänderungen von 57.9 ± 3.3 mV ($\pm$ SEM)).

variiert wurde, direkt untersucht. In diesem Fall führte der Lösungswechsel zu einer biphasischen Antwort. Erhöhung des $p\text{CO}_2$ führte zunächst zu einer Depolarisation und anschliessend zu einer länger anhaltenden Hyperpolarisation. Eine ähnliche

biphasische Antwort wurde auch in Teil (a) beobachtet, als das Medium von 46 mM HCO_3^- /5% CO_2 durch 23 mM HCO_3^- /Luft ersetzt wurde. Dies ist durch den Pfeil in Bild 4 markiert. Dies legt nahe, daß auch in diesem Fall die biphasische Antwort - die nie bei einer Änderung von $[\text{HCO}_3^-]$ bei konstantem pCO_2 gefunden wurde - auf die gleichzeitig erfolgende Änderung des CO_2 -Gehaltes zurückzuführen ist. Diese biphasischen Antworten traten konsistent in acht Experimenten auf. Die erste Phase (Depolarisation) verschwand allmählich nach einigen Minuten fortgesetzten Lösungswechsels (wie in Bild 4, Teil (a), Verlauf nach dem Pfeil). Die Spannungsantwort auf einen Wechsel von luftbegaster Lösung zu einer CO_2 -begasten (5%) betrug im Mittel bei 23 mM HCO_3^- 13.3 ± 1.3 mV (SEM, n=4). Ähnliche Reaktionen auf Änderungen des pCO_2 wurden auch bei einer Bikarbonatkonzentration von 10 mM gefunden.

3.3 Einfluß von Bikarbonat auf die Kaliumleitfähigkeit

Da von mehreren Zelltypen bekannt ist, daß die Kaliumleitfähigkeit pH-abhängig ist, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt, um den Einfluß des Bikarbonatentzuges auf die Kaliumleitfähigkeit zu überprüfen. Ein Experiment des ersten Typs ist in Bild 6 dargestellt. Um die Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran im Kontrollringer zu testen, wurde zunächst die extrazelluläre Kaliumkonzentration von 5 mM auf 40 mM erhöht. Dies führte zu einer schnellen, reversiblen Depolarisation. Im nächsten Schritt wurde die Zelle mit einer nominell bikarbonatfreien Lösung perfundiert. Wie bereits bekannt, führte dies zu einer Depolarisation. Im bikarbonatfreien System wurde der Test mit hohem extrazellulärem Kalium wiederholt. Die dadurch hervorgerufenen Spannungsänderungen waren nun kleiner (um ungefähr 30%). Die aus derartigen Experimenten berechneten Abhängigkeiten $\Delta V / \Delta \log[\text{K}]$ verringerten sich von 26.5 ± 3 mV/Dekade (SD, n=12) auf 18.8 ± 4 mV/Dekade in bikarbonatfreiem Medium ($p < 0.005$, t-test).

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde die Reaktion auf Bikarbonatentzug in An- und Abwesenheit des Kaliumka-

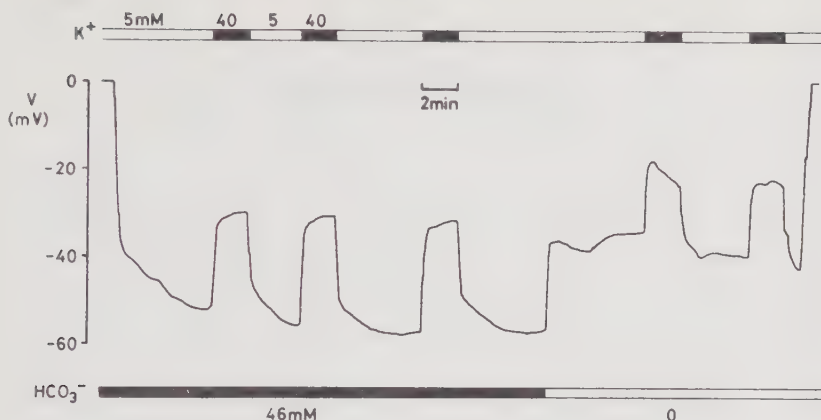


Bild 6: Variation der extrazellulären Kaliumkonzentration in An- und Abwesenheit von Bikarbonat. $[K]_o$ wurde von 5 mM auf 40 mM erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden in 8 Experimenten erzielt. (Benutzte Lösungen: 1, 4, 21, 22)

nalblockers Barium (1mM) getestet. Ein typisches Experiment ist in Bild 7 gezeigt. Wie von einer Zelle, deren Membranspannung V weitgehend durch eine Kaliumleitfähigkeit bedingt ist, zu erwarten, depolarisierte die Zelle durch die Zugabe von Barium. Dieser Effekt war völlig reversibel. Nachdem Barium aus dem Medium entfernt wurde, kam es zu einem kleinen Überschwinger von V . Dies lässt sich möglicherweise durch die in der Zwischenzeit durch die Na^+/K^+ -ATPase erfolgte Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration erklären. Wie in Bild 7 durch die Pfeile betont, nahm die durch Bikarbonatentzug hervorgerufenene Gleichgewichtsdepolarisation bei Anwesenheit von Ba^{++} um ca. 40% ab. Die Depolarisation sechs Minuten nach Bikarbonatentzug nahm im Mittel von -16.4 ± 4 mV (SD, $n=11$) auf 9.2 ± 8 mV ($n=6$) in der Anwesenheit von Barium ab ($p < 0.05$, t-test). Die vorübergehenden Spannungsänderungen unter Bikarbonatentzug oder -zugabe wurden durch Barium jedoch nicht unterdrückt. Im Gegenteil nahm die Hyperpolarisation nach Zugabe

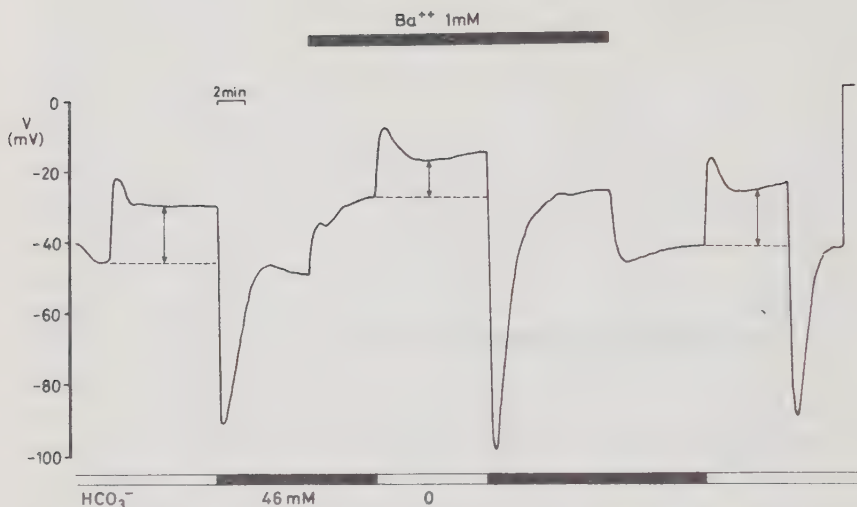


Bild 7: Reaktion von V auf Bikarbonatentzug in An- und Abwesenheit des Kaliumkanalblockers Barium (1mM). Barium verursachte eine Verringerung der Gleichgewichtsdepolarisation nach Bikarbonatentzug. Dies ist durch Pfeile verdeutlicht. Sechs andere Experimente ergaben ähnliche Resultate. (Verwendete Lösungen: 1, 4, 23, 24)

von Bikarbonat unter Barium sogar leicht zu. Dies schließt eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit als alleinige Erklärung für die durch $[\text{HCO}_3^-]$ -Änderungen erzeugten Spannungsspitzen praktisch aus.

3.4 Einfluß des intrazellulären pH

In Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, daß Erhöhung des CO_2 -Druckes zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führt. Dies lässt sich möglicherweise durch eine intrazelluläre Ansäuerung der Zelle erklären, da CO_2 als kleines apolares Molekül leicht die Plasmamembran durch Diffusion überqueren kann (35) und intrazellulär durch die Carboanhydrase in Kohlensäure umgewandelt

werden kann.

Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, bei der der intrazelluläre pH (pH_i) durch verschiedene Methoden verändert wurde. Dies wurde durch die extrazelluläre Zugabe verschiedener permeabler schwacher Basen und Säuren erreicht (eine Übersicht über diese Methoden ist in (80) gegeben). Wie es in Bild 8 gezeigt wird, können schwache Säuren und Basen die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran in ihrer elektrisch neutralen Form durch Diffusion passieren. Im Zytoplasma dissoziieren die schwachen Säuren und bilden H^+ und A^- . Im Falle der schwachen Base NH_3 bindet dieses Molekül ein Proton und bildet NH_4^+ . Dies führt im ersten Fall zu einer intrazellulären Ansäuerung, im zweiten Fall zu einer Alkali-

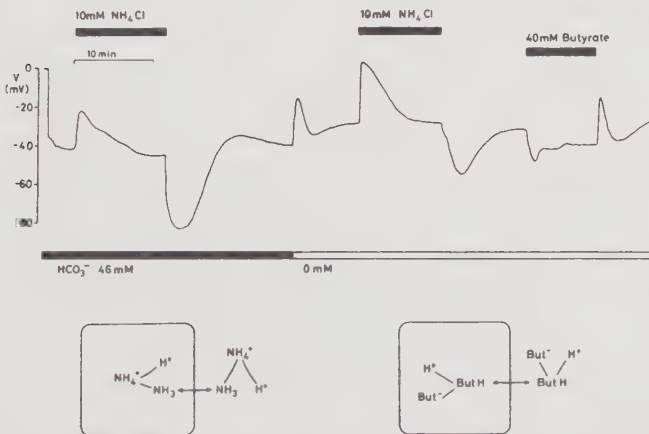


Bild 8: Reaktion von V auf Veränderungen des intrazellulären pH, die durch extrazelluläre Zugabe von Ammonium oder Butyrat hervorgerufen wurde. Der Mechanismus ihrer Wirkung auf den pH ist in dem unteren Diagramm skizziert. Ähnliche Effekte von NH_4Cl wurden in 10 Experimenten beobachtet, von Butyrat in 2 Experimenten. Die unterschiedliche Reaktion auf Ammonium in bikarbonat-reicher und -freier Lösung wurde in zwei Versuchen verglichen und gab ähnliche Resultate. (Verwendete Lösungen: 1, 4, 17, 18, 20)

sierung. Man erhält pH-Änderungen in der entgegengesetzten Richtung, wenn man diese Säuren oder Basen nach einer ausreichenden Äquilibrierungszeit wieder entzieht.

In dem in Bild 8 gezeigten Experiment wurde zunächst 10 mM NH_4Cl in bikarbonat-reichem Ringer (Lös. 1) zugegeben. Dies sollte zu einer intrazellulären Alkalisierung führen. Die Zelle depolarisierte unter diesem Lösungswechsel. Nach 12 min wurde das extrazelluläre Ammonium wieder entfernt, was mit einer zytoplasmatischen Ansäuerung einhergehen sollte. In diesem Fall wurde eine vorübergehende Hyperpolarisation beobachtet. In anderen Experimenten ergab sich, daß das Ausmaß dieser Hyperpolarisation abhängig von der Präinkubationsdauer mit NH_4Cl war. Auch dies deutet auf einen Effekt von pH_i auf V hin, da von Arbeiten mit pH-sensitiven Mikroelektroden bekannt ist, daß das Ausmaß der intrazellulären Ansäuerung mit der Präinkubationszeit mit NH_4^+ zunimmt (10).

Im nächsten Schritt wurde der Zelle das extrazelluläre Bikarbonat entzogen, was zu der bereits bekannten Depolarisation führte, und von neuem Ammoniumchlorid hinzugegeben. Dies führte erneut zu einer vorübergehenden Depolarisation, deren Amplitude sogar grösser als in bikarbonat-haltigem Medium war. Wiederum nach 12 Minuten wurde Ammonium aus der Badlösung entfernt, was abermals eine, diesmal aber geringere, Hyperpolarisation von V hervorrief. Diese veränderten Amplituden könnten durch eine Veränderung der zytoplasmatischen Pufferkapazität nach Entzug von $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ erklärt werden (*).

Danach wurde das schwache Säureanion Butyrat in nominell

(*) Im Säugetiermuskel beispielsweise trägt das $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -System bei $\text{pCO}_2=37$ mmHg (5 % CO_2) ungefähr 40% zur zytoplasmatischen Pufferkapazität bei (1, 80, 88). Daher könnte die Zugabe von Ammoniumchlorid im bikarbonatfreien System zu einer stärkeren Erhöhung des intrazellulären pH und damit zu einer ausgeprägteren Spannungsantwort führen. Die geringere Hyperpolarisation, die nach NH_4Cl -Entzug im bikarbonatfreien System beobachtet wurde, ist möglicherweise auf eine verringerte intrazelluläre Anhäufung von NH_3 und NH_4^+ zurückzuführen, da die Konzentration der letztgenannten Verbindung bei dem jetzt vorhandenen alkalischeren pH vermindert sein sollte. Daher

bikarbonat-freier Lösung zugegeben. Dies sollte, ähnlich wie Entzug von Ammonium, zu einer intrazellulären Ansäuerung führen. Dabei wurde ebenfalls eine Hyperpolarisation beobachtet. Entzug von Butyrat führte zu einer Depolarisation, die der nach Bikarbonatentzug weitgehend ähnelte.

Der Effekt einer Änderung von pH_i auf das Membranpotential wurde auch durch extrazelluläre Gabe von Glycodiazin (25 mM) untersucht (Bild 9). Glycodiazin ist eine schwache Säure, die in vielen bikarbonattransportierenden Epithelien wie der Niere (92) oder dem Pankreas (84) Bikarbonat weitgehend - was die

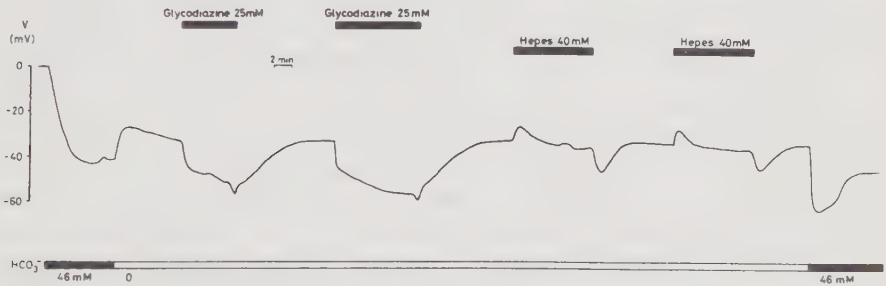


Bild 9: Einfluss von 25 mM Glycodiazin und 40 mM HEPES auf V in nominell bikarbonatfreier Lösung. Ein ähnlicher Effekt von Glycodiazin wurde in 7 Experimenten beobachtet. In 3 Experimenten änderte sich V unter Erhöhung der HEPES-Konzentration von 10 auf 40 mM nicht. In 2 Versuchen wurde eine ähnliche Reaktion wie die hier dargestellte gefunden. (Verwendete Lösungen: 1, 4, 19, 25)

kann weniger NH_3 die Zelle verlassen, was zu einer geringeren Ansäuerung und damit einhergehenden Hyperpolarisation führt.

Andererseits ist in der nominellen Abwesenheit von Bikarbonat die intrazelluläre Konzentration von Bikarbonat sicherlich grösser als die extrazelluläre. Daher sollte dann in der Anwesenheit einer Bikarbonatleitfähigkeit die durch NH_4^+ -Gabe hervorgerufene Depolarisation grösser als die bei Ammoniumentzug beobachtete Hyperpolarisation sein.

Transportraten betrifft - ersetzen konnte. Ähnlich wie die extrazelluläre Gabe von Butyrat erzeugte auch Glycodiazin eine Hyperpolarisation. Um auszuschliessen, daß die oben dargestellten Resultate lediglich auf eine erhöhte extrazelluläre Pufferung zurückzuführen sind, wurde HEPES, ein zwitterionischer Puffer, der nur schlecht in die Zelle permeiert, in hoher Konzentration (40 mM) zugegeben. In einigen Experimenten blieb V unbeeinflusst, in einigen anderen, wie in Bild 9, rief die Zugabe eine leichte vorübergehende Depolarisation, der Entzug eine leichte Hyperpolarisation hervor. Die Spannungsantworten waren jedoch immer kleiner als die von Butyrat oder Glycodiazin hervorgerufenen. Das legt die Vermutung nahe, daß auch dieser Puffer in geringem Masse in die Zelle eindringt. Dies könnte entweder in der protonierten Form geschehen, wobei positive Ladung mit dem Molekül transportiert wird. Andererseits könnte es in der zwitterionischen Form permeieren, was zu einem Anstieg von pH_i führen sollte. In beiden Fällen würde man eine Depolarisation der Membran erwarten. (*)

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, daß - unabhängig von der benutzten Methode - eine intrazelluläre Ansäuerung zu einer Hyperpolarisation, eine Alkalisierung zu einer Depolarisation führt. Diesen Effekt könnte man durch eine Leitfähigkeit für H^+ , OH^- oder HCO_3^- erklären. Wenn dies richtig ist, dann sollten auch extrazelluläre pH-Änderungen zu vergleichbaren Resultaten führen.

3.5 Einfluß des extrazellulären pH

Der Einfluß des extrazellulären pH (pH_o) auf das Membranpotential V wurde in bikarbonatfreier, HEPES-gepufferter Lösung untersucht. Der pH-Wert konnte in sechs Stufen zwischen pH 7.0 und pH 8.0 variiert werden. Um Komplikationen durch Adaptation des intrazellulären pH zu vermeiden, wurde der Lösungswechsel

(*) Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die Reaktion auf die Änderung von $[\text{Na}^+]_o$, von 151 auf 136 mM (Lös. 4 zu Lös. 26). Wie später gezeigt wird (Abschn. 3.9) sollte auch dies zu einer, wenn auch geringeren, Depolarisation führen.

in Abständen von je einer Minute durchgeführt.

Ein derartiges Experiment ist in Bild 10 wiedergegeben. Änderung des extrazellulären pH führte zu transienten Spannungsänderungen, deren Amplitude mit der Größe der pH-Änderung zunahm. In vielen Experimenten war dabei die Abhängigkeit der Spannungsänderung von dem pH-Wert nicht linear. Die mittlere Änderung von V auf einen pH-Sprung von 7.0 zu 8.0 betrug 11.4 ± 3 mV (SD, $n=8$).

Bei Änderungen des extrazellulären pH war die Alkalisierung mit einer Hyperpolarisation und die Ansäuerung mit einer Depolarisation verbunden. Bei Änderungen von pH_i verhielt es sich umgekehrt: Alkalisierung führte zu einer Depolarisation, Ansäuerung zu einer Hyperpolarisation. Dies deutet darauf hin, daß möglicherweise pH-Gradienten über der Plasmamembran (oder dadurch sekundär erzeugte Bikarbonatgradienten) für die beobachteten Spannungsänderungen verantwortlich sind.

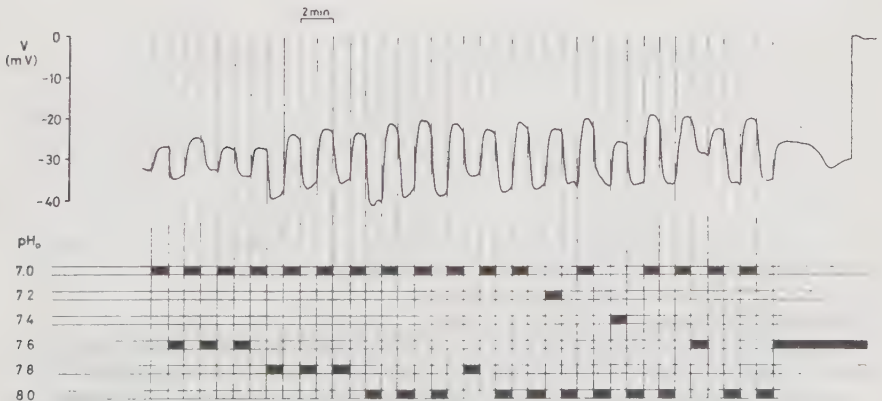


Bild 10: Einfluß des extrazellulären pH in nominell bikarbonatfreier Lösung auf V . Die Antwort auf pH_o wurde in 8 Zellen untersucht. Dabei wurde bei einem Wechsel von pH 7.0 zu pH 8.0 eine Spannungsänderung von 11.4 ± 3 mV (SD) gemessen.

3.6 Einfluß von Inhibitoren der Karboanhydrase und des Anionentransportes auf die Bikarbonat- und pH-Reaktion

Methazolamid, ein Inhibitor der Carboanhydrase, führte, wie in Bild 11 gezeigt, zu einer Verringerung der Spannungsänderungen auf $\text{HCO}_3^-/\text{pCO}_2$. Die Verringerung unter Methazolamid war dabei voll reversibel.

Die Stilbendisulfonsäure-Derivate DIDS und SITS, die als Inhibitoren von Anionentransportvorgängen an Erythrocyten und anderen Zellen bekannt sind, verursachten ebenfalls eine Verringerung der Spannungsantwort auf Veränderungen der Bikarbonatkonzentration. Sie konnten diese aber auch in hoher Dosierung (10^{-3} M) nicht völlig unterdrücken. Eine typische Registrierung ist in Bild 12 gezeigt. DIDS ($2 \cdot 10^{-4}$ M) bewirkte eine irreversible Verminderung der Spannungsantwort. Dies ist aus dem zweiten Teil der Registrierung zu erkennen, die eine

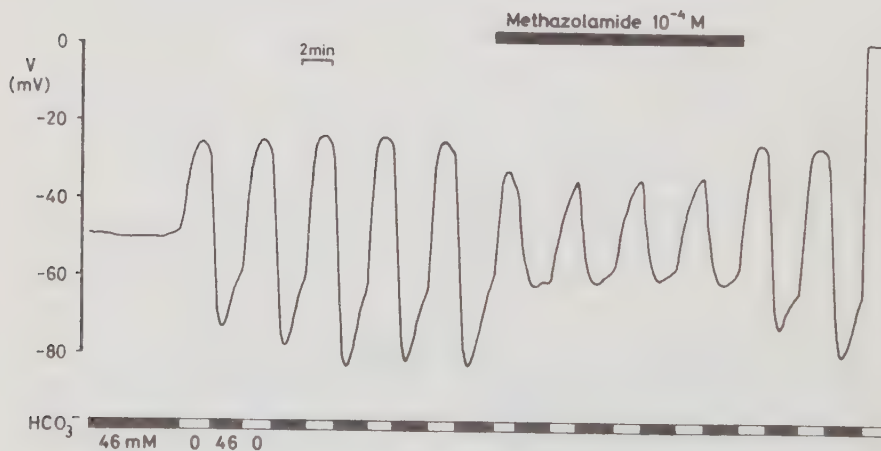


Bild 11: Einfluß von Methazolamid (10^{-4} M) auf die durch Änderungen der Bikarbonatkonzentration hervorgerufenen Änderungen von V . Die Badlösung wurde in Abständen von 2 Minuten gewechselt (Lös. 1 und 4). Eine ähnliche Verringerung der Spannungsänderungen unter Methazolamid wurde in 8 Experimenten erhalten.

Fortsetzung der Messung an derselben Zelle nach 58 Minuten darstellt. Man erkennt, daß Methazolamid die durch Präinkubation mit DIDS schon reduzierte Antwort noch weiter verringerte. Dies läßt darauf schliessen, daß diese Inhibitoren auf verschiedene Prozesse einwirken.

Bild 13 zeigt ein anderes Experiment, bei dem der Wechsel der Bikarbonatkonzentration in größeren zeitlichen Abständen vorgenommen wurde. SITS in einer Konzentration von 10^{-4} M bewirkte keine Änderung des Ruhemembranpotentials, inhibierte aber die durch Wiedertzugabe von Bikarbonat bewirkte Hyperpolarisation der Zellmembran. Während des abermaligen Entzugs von Bikarbonat befand sich kein SITS mehr in der Perfusionslösung, was eine irreversible Wirkung auch von SITS demonstriert.

Die Wirkung dieser beiden Inhibitoren wurden auch in bikarbonatfreier Lösung getestet. Als Beispiel wird in Bild 14 der Einfluß von Methazolamid auf die durch Applikation von NH_4Cl

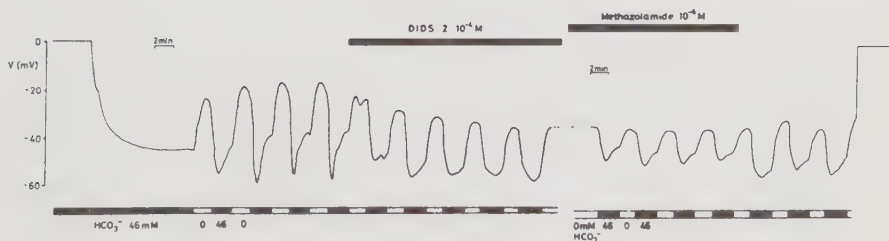


Bild 12: Einfluß von DIDS und Methazolamid auf die Spannungsantwort auf Bikarbonat. Im ersten Teil ist die Reduktion der Amplitude durch DIDS (10^{-4} M) gezeigt. Der zweite Teil ist die Fortsetzung der Registrierung der gleichen Zelle nach 58 Minuten. Ähnliche Effekte von DIDS oder der verwandten Substanz SITS wurden in 4 Experimenten beobachtet. (Verwendete Lösungen: 1 und 4 mit entsprechenden Inhibitoren)

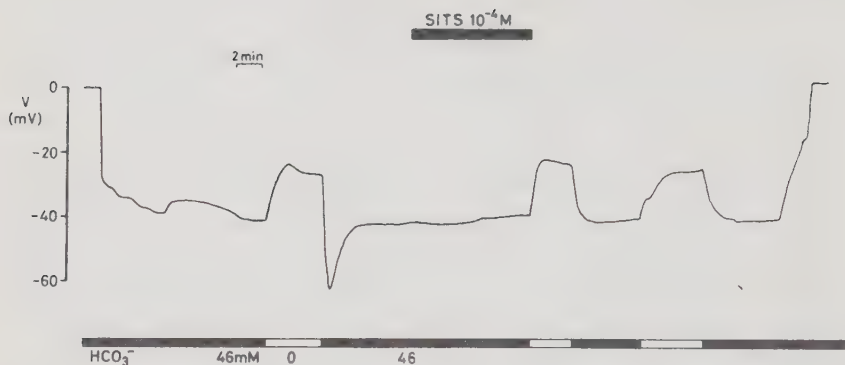


Bild 13: Einfluß von SITS (10^{-4} M) auf die durch Bikarbonat hervorgerufenen Potentialänderungen. Während der durch den Balken angegebenen Zeit enthielt die Lösung 10^{-4} M SITS. Ähnliche Verringerungen der Hyperpolarisation durch SITS wurden in 6 Experimenten beobachtet (zusätzlich zu den in Bild 12 angegebenen Experimenten). (Lös. 1, 4)

erzeugten transmembranalen pH-Gradienten gezeigt. Im Gegensatz zu Bild 8 hatte der Spannungsverlauf nach Entzug von Ammoniumchlorid mehrere Phasen. Sowohl Verläufe wie in Bild 8 als auch wie in Bild 14 wurden in mehreren Experimenten beobachtet. Auch andere Autoren (8) beschreiben variable zwei- und dreiphasige Spannungsverläufe nach Gabe von NH_4Cl . In unserem Fall könnte man die schnelle Hyperpolarisation nach Ammoniumentzug eventuell auf einen Efflux von NH_4^+ und die darauf folgende langsamere Hyperpolarisation auf eine Senkung des zyttoplasmatischen pH, was, wie in Abschnitt 3.4 gezeigt wurde, eine Hyperpolarisation zur Folge hat, zu erklären versuchen.

Wie in Bild 14 gezeigt, reduzierte Methazolamid auch die Spannungsantwort auf pH-Gradienten in nominell bikarbonatfreier Lösung, während DIDS keine eindeutige Wirkung hatte.

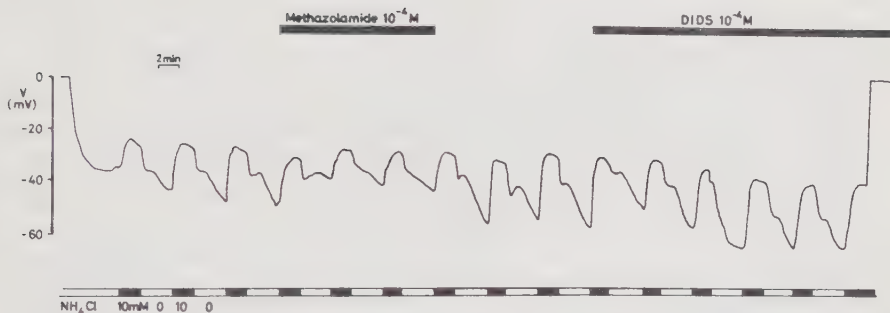


Bild 14: Einfluß von Methazolamid (10^{-4} M) und DIDS (10^{-4} M) auf die durch NH_4Cl hervorgerufenen Spannungsänderungen in nominell bikarbonatfreier Lösung. Ähnliche Effekte von Methazolamid und DIDS wurden in drei Experimenten beobachtet. (Lös. 4, 18 mit entspr. Inhibitoren)

3.7 Kationenabhängigkeit der Bikarbonatreaktion

Die Kationenabhängigkeit der Bikarbonatreaktion wurde untersucht, indem die durch Wechsel der Bikarbonatkonzentration hervorgerufenen Änderungen der Membranspannung V bei verschiedener Kationenzusammensetzung der Lösung gemessen wurde. Ein typisches Experiment dieser Art ist in Bild 15 dargestellt. Zunächst wurde die Bikarbonatkonzentration periodisch von 46 zu 10 mM (bei 5% CO_2) in einem Lithium-Ringer gewechselt. Wie oben für entsprechende Bikarbonatänderungen in Na-Ringer beschrieben, führte eine Verringerung von $[\text{HCO}_3^-]_0$ zu einer Depolarisation, Erhöhung zu einer Hyperpolarisation. Nachdem Lithium durch Cholin ersetzt wurde, verringerten sich diese Reaktionen. Sie wurden jedoch nicht völlig unterdrückt. Nach einer abermaligen Überprüfung der Reaktion in Lithium-Ringer, die ähnliche Resultate lieferte, wurde Lithium durch Natrium ersetzt. Bei der ersten Zugabe von Natrium, die gleichzeitig mit der hohen Konzentration (46 mM) Bikarbonat

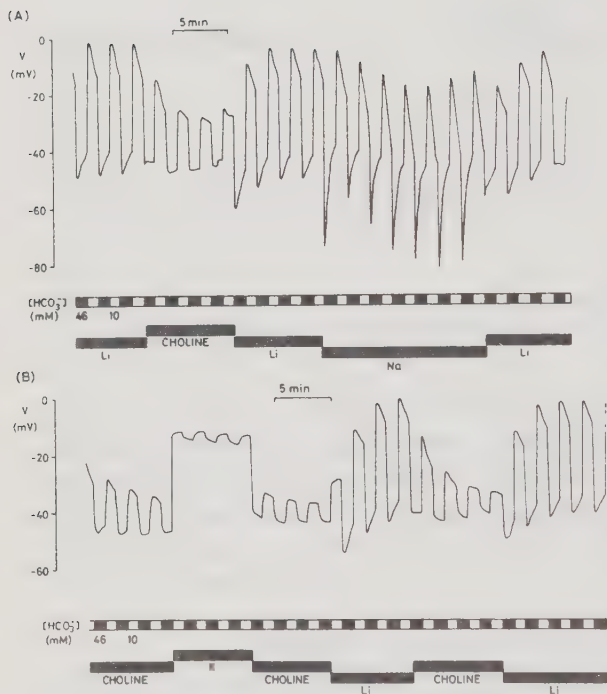


Bild 15: Abhängigkeit der Reaktion von V auf Änderungen von $[\text{HCO}_3^-]_O$ von der Kationenzusammensetzung der Badlösung. $[\text{HCO}_3^-]_O$ zwischen 10 und 46 mM bei konstant 5% CO_2 gewechselt. Das hauptsächlich im Medium vorhandene Kation ist durch die Balken angegeben. Die zweite Re-

gistrierung (B) stammt von einer Zelle aus derselben Kulturschale. Sie beginnt 10 min nach dem Ende der ersten. (Lösungen: 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12)

erfolgte, hyperpolarisierte die Zelle stark. Danach war die Reaktion geringer, stieg aber langsam über einige Minuten in Vergleich zu der unter Li beobachteten an. Die totale Amplitude der Spannungsänderungen war größer als in Li-Ringer. Während die Form des Spannungsverlaufs in Li-Ringer annähernd symmetrisch war, war jetzt die Hyperpolarisation durch $[\text{HCO}_3^-]_O$ -Erhöhung größer als die durch $[\text{HCO}_3^-]_O$ verursachte Depolarisation.

Teil (B) ist die Registrierung einer anderen Zelle dersel-

ben Kulturschale. Sie zeigt, daß Kalium-Ringer zu einer schnellen, reversiblen Depolarisation der Zelle führt. Die bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen sind sehr stark reduziert, sogar stärker, als in Cholin-Ringer. Zugabe von Lithium führte später wieder zu einer Verstärkung der Reaktion.

Nach einer Änderung der extrazellulären Kationenzusammensetzung benötigte die Spannungsantwort auf Bikarbonat einige Minuten, um eine stabile Form anzunehmen. Da - wie durch die schnelle Reaktion auf Bikarbonat gezeigt - der extrazelluläre Lösungswechsel (zumindest an der apikalen Membran) schneller von statten geht, deutet dies darauf hin, daß ein langsam austauschendes Kompartiment (wie z.B. der Intrazellulärraum) an diesem Effekt beteiligt ist.

Bild 16 faßt die Resultate mehrerer derartiger Experimente zusammen. In Bild 16 (A) wurde die totale Amplitude der Spannungsänderung ausgewertet, während in (B) nur die innerhalb weniger Sekunden auf den Lösungswechsel erfolgenden Auf- oder Abstriche der Spannung berücksichtigt wurden. Es zeigt sich - wie in dem Einzelexperiment aus Bild 15 - daß Lithium weitgehend Natrium in Bezug auf die bikarbonat-induzierten V-Änderungen ersetzen konnte. Betrachtet man nur die sofortigen Reaktionen (Bild 16(B)), so ist kein signifikanter Unterschied zwischen Na- und Li-Ringer festzustellen. Kalium und Cholin verringerten diese jedoch signifikant. In einigen anderen Experimenten wurden auch andere große organische Kationen (Tetramethylammonium und Bis(2-hydroxyethyl)dimethylammonium für Natrium substituiert. Dies führte zu ähnlichen Resultaten wie der Cholinringer. Es kann gefolgert werden, daß unter physiologischen Bedingungen Na eine wichtige Rolle bei der bikarbonat-induzierten Spannungsänderung spielt.

3.8 Einfluß von Natriumentzug auf V

Entzug und Wiedergabe von Natrium im extrazellulären Medium führte zu Spannungsänderungen, die den entsprechenden bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen ähnelten. Dies demonstriert das Experiment aus Bild 17, in dem im Bad die Natrium-

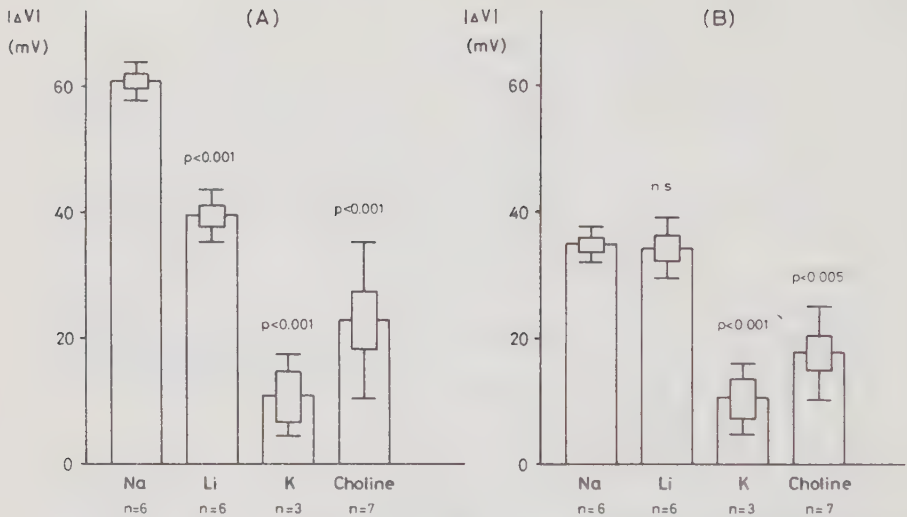


Bild 16: Bikarbonat-induzierte Spannungen als Funktion des hauptsächlich extrazellulären Kations. Die Daten wurden aus ähnlichen Experimenten wie in Bild 15 gewonnen. (A) ist ein Diagramm der totalen Amplitude des Signals, während (B) das arithmetische Mittel aus dem direkt auf $[\text{HCO}_3^-]_o$ -Änderung erfolgenden Auf- und Abstrichen darstellt. Die Anzahl der untersuchten Zellen ist unter den Säulen angegeben. Die Fehlerlinien geben SD an, die Balken SEM. Die Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte bezogen auf Na (t-test) ist über den Säulen angegeben. Für die restlichen Paare ergab sich:

(A) Li-Cholin: $p < 0.005$, Li-K: $p < 0.001$, Cholin-K: $p < 0.1$ (n.s.)

(B) Li-Cholin: $p < 0.05$, Li-K: $p < 0.001$, Cholin-K: $p < 0.2$ (n.s.)

ionen dreimal durch gleiche Mengen an Cholin ersetzt wurden. Die Perfusionszeit mit Natrium-freiem Ringer wurde von 15 über 30 auf 60 Sekunden gesteigert. Natriumentzug führte in allen drei Fällen zu einer raschen Depolarisation nahezu gleicher Amplitude. Bei der benutzten Perfusionsgeschwindigkeit wurde die maximale Depolarisation nach weniger als 10 Sekunden nach Beginn des Lösungswechsels beobachtet. Nach diesem schnellen Abfall begann die Spannung wieder langsam anzusteigen. Wieder-

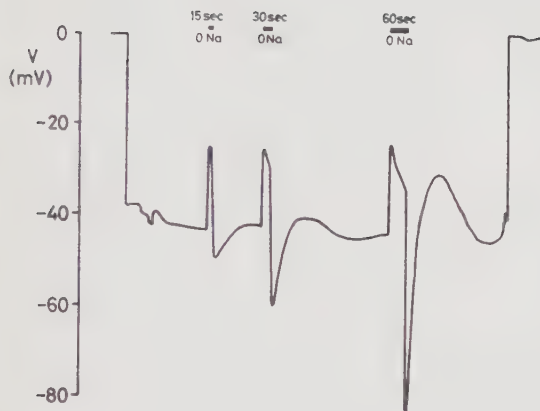


Bild 17: Einfluß von Natriumentzug auf V. Während der durch die Balken angegebenen Zeiträume wurde Natrium durch Cholin im bikarbonat-reichen Ringer (Lös. 1 durch Lös. 5) ersetzt. Beachte die Zunahme der durch Natriumzugabe hervorgerufenen Hyperpolarisation mit der Zeit der Präinkubation in Natriumfreier Lösung. Während der Erholungsphase nach dem letzten Natriumfreien Puls wurde die

Ableitung instabil und das Potential brach schließlich zusammen. Eine ähnliche Reaktion auf Natriumentzug und Wiederzugabe wurde in mehr als 50 Zellen von mehr als 8 verschiedenen Zelllinien gefunden.

zugabe von Na führte zu einer schnellen, vorübergehenden Hyperpolarisation. Ihre Amplitude nahm, ähnlich wie bereits für Bikarbonat beschrieben (siehe Abschnitt 3.2.1), mit der Zeit der Präinkubation in Na-freiem Ringer zu. Nach dieser Hyperpolarisation oszillierte V langsam über mehrere Minuten, bevor es von Neuem den Gleichgewichtswert erreichte. Die Größe der Hyperpolarisation nach Wiederzugabe von Na war auch bei gleicher Na-Entzugszeit zwischen den einzelnen Experimenten recht variabel, während die Depolarisation durch Na-Entzug relativ konstant blieb. Die Hyperpolarisation war bei den Zellen größer, deren Spannung nach der durch Na-Entzug verursachten De-

polarsiation wieder schnell zu steigen anfang (vergleiche Bild 17, 18, 19). Manchmal, bei Na-Entzug von einer Minute oder mehr, erreichte V bei Wiedereinführung von Na Werte von über -100 mV.

In einigen Experimenten wurde auch Tetramethylammonium für Natrium substituiert. Dies führte zu ähnlichen Ergebnissen.

Diese Experimente legen einen Zusammenhang zwischen den elektrischen Erscheinungen und transmembranalen Natriumbewegungen nahe, ähnlich wie dies bereits für Bikarbonat diskutiert wurde (s. Absch. 3.2.1). Inkubation der Zelle in Na-freiem Medium sollte zu einer fortschreitenden Verringerung der intrazellulären Na-Konzentration führen. Wird nun Na wieder hinzugegeben, so hat der transmembranale Na-Gradient mit der Zeit der Präinkubation zugenommen, was zu einem verstärkten Einstrom von Na in die Zelle führen könnte. Die Richtung der beobachteten Spannungsänderung ist jedoch mit einer Leitfähigkeit für Na-Ionen unvereinbar, da in diesem Fall die Änderungen von V die umgekehrte Polarität haben müßte. Die Zelle verhält sich so, als wäre ein Nettoflux negativer Ladung an einen Natriumflux gekoppelt.

3.8.1 Einfluß von Bikarbonat auf die Natriumreaktion

Die Na-induzierten Änderungen von V sind abhängig von Bikarbonat. Dies zeigt das Experiment aus Bild 18, in dem an derselben Zelle die Reaktionen auf Na-Entzug und Wiederezugabe in Kontrollringer (46 mM HCO_3^- , 5% CO_2) und in nominell bikarbonatfreier Lösung (luftbegast) durchgeführt wurde. Bikarbonat-entzug führte zu der bereits bekannten Depolarisation. In der bikarbonatfreien Lösung war die Spannungsantwort auf Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration weit reduziert. Nach Wiederezugabe von Bikarbonat (die zusammen mit der Zugabe von Na erfolgte und dabei eine starke Hyperpolarisation hervorrief), wurde die ursprüngliche Reaktion wiederhergestellt. In einigen Experimenten wurde sogar eine Vorzeichenänderung der Reaktion in bikarbonat-freiem Ringer beobachtet: Jetzt führte Na-Zugabe zu einer Depolarisation, Na-Entzug zu einer Hyperpo-

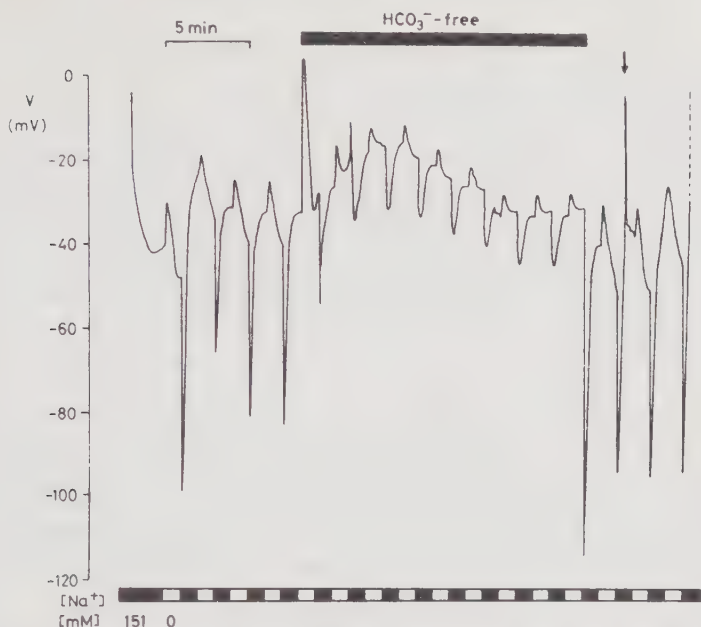


Bild 18: Einfluß von Bikarbonat auf die Na-induzierten Spannungsänderungen. Während der durch den Balken angegebenen Zeit wurde die Zelle mit nominell bikarbonatfreier Lösung umspült, in der restlichen Zeit mit 46 mM HCO_3^- /5% CO_2 . Zu dem durch den Pfeil gekennzeichneten Moment wurde die Registrierung instabil und es wurde eine neue Zelle punktiert, indem die Elektrode durch den Stepper weiter vorgeschoben wurde. Ähnliche Abhängigkeiten der Na-induzierten V-Änderung von Bikarbonat wurden in mehr als 11 Zellen 6 verschiedener Zelllinien beobachtet. (Lös. 1, 4, 5, 7)

larisation.

Folglich sind Bikarbonat-induzierte V-Änderungen abhängig von Natrium, und Natrium-induzierte V-Änderungen abhängig von Bikarbonat. Dies könnte ein Hinweis auf einen gekoppelten elektrogenen Transport beider Spezies sein.

3.8.2 Einfluss von Inhibitoren des Anionentransportes auf die Natriumreaktion

In Abschnitt 3.6 wurde gezeigt, daß die Stilbenderivate SITS und DIDS die Bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen reduzieren. Wenn, wie vermutet, Na^+ und HCO_3^- durch denselben Prozess transportiert werden und durch diesen (elektrogenen) Transport die beobachteten Änderungen von V auftreten, dann sollten auch die Na -induzierten V -Änderungen durch Stilbene reduziert werden.

Das Experiment aus Bild 19 zeigt, daß dies in der Tat der Fall ist. Natrium wurde in der Anwesenheit von $46 \text{ mM } \text{HCO}_3^-$ durch Cholin ersetzt, zuerst nur für 30 Sekunden, später periodisch in 1-minütigen Abständen. Dies zeigt wiederum die oben beschriebene Abhängigkeit der durch Wiederaufgeben von Na erzeugten Hyperpolarisation von der Präinkubationszeit in Na -freiem Medium. Die Zugabe von DIDS (10^{-3} M) (oder in anderen

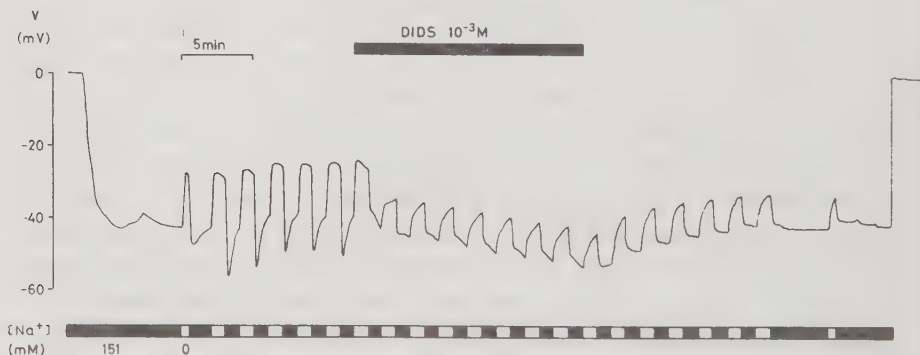


Bild 19: Einfluß von DIDS auf die Na -induzierten Änderungen von V . In der Anwesenheit von $46 \text{ mM } \text{HCO}_3^-$ wurde Natrium regelmäßig durch Cholin ersetzt. Während der durch den Balken markierten Zeit befand sich DIDS (10^{-3} M) in der Badlösung. Eine ähnliche Reduktion der Antwort von V auf Na wurde in 12 Zellen aus 6 verschiedenen Zelllinien gefunden. (Lös.: 1, 5 mit entspr. Inhibitoren)

Experimenten der verwandten Substanz SITS) reduzierte sowohl die schnelle Hyper- als auch die Depolarisation. Auch nachdem DIDS wieder aus dem Bad entfernt wurde, blieb die Reaktion von V weiterhin reduziert. Dies zeigt die irreversible Wirkung von DIDS auf diesen Prozess. In einigen Experimenten wurde, ähnlich wie in nominell bikarbonat-freien Systemen, auch eine Umkehrung der Spannungsantwort auf Na unter DIDS beobachtet.

Die Gesamtheit dieser Experimente deutet somit auf die Existenz eines elektrogenen, Stilben-inhibierbaren Cotransport für Natrium und Bikarbonat hin.

3.9 Quantitativer Vergleich der Potential- änderungen unter Na- und Bikarbonatvariation

Um quantitative Informationen über die Reaktion von V auf Na- und HCO_3^- -Konzentrationsänderungen zu erhalten, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die Konzentration beider Ionen schrittweise bei gleichzeitiger Messung von V einer Einzelzelle variiert. Ein derartiges Experiment ist in Bild 20(A) dargestellt. Die extrazelluläre Bikarbonatkonzentration wurde in 3 Schritten zwischen 46, 23 und 10 mM (alle Lösungen mit 5% CO_2 begast) in der Anwesenheit von 151 mM Natrium verändert, während Natrium in der Anwesenheit von 46 mM HCO_3^- in 5 Schritten (151, 70, 35, 17, 8 mM) variiert wurde. In diesen Versuchen wurde HCO_3^- durch Cl^- und Na^+ durch Cholin^+ ersetzt. Man ersieht sofort aus diesem Experiment, daß V stärker auf HCO_3^- als auf Na^+ reagiert. Außerdem scheint die Reaktion auf Natriumkonzentrationsänderungen mit grösseren Konzentrationsprüngen in die Sättigung zu gehen.

Diese scheinbare Sättigung der V-Antwort auf Na wurde in dem Versuch von Bild 20(B) näher untersucht. Zunächst wurde die $[\text{Na}^+]_o$ wie in Bild 20(A) von 151 mM in kurzen Zeiträumen auf geringere Werte gesenkt. In dem darauf folgenden Teil wurde die Konzentrationsprung aus Präinkubationslösungen mit zunehmend geringerer Na-Konzentration durchgeführt. Dabei wurde $[\text{Na}^+]_o$ jeweils auf ungefähr die Hälfte des Ausgangswertes reduziert. Wie man aus der Registrierung erkennt, nahm dabei die

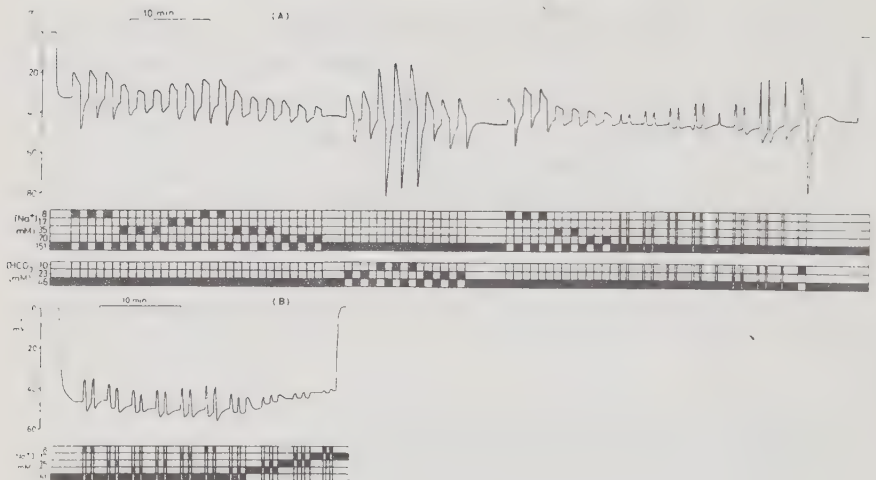


Bild 20: Quantitative Untersuchung der durch Na und HCO_3^- verursachten Änderungen von V

(A) Vergleich der Effekte von Na und HCO_3^- an derselben Zelle. Zuerst wurden die Lösungen in 1-minütigen Abständen zu weniger Na oder HCO_3^- enthaltenden Lösungen gewechselt. Danach erfolgte dieser Wechsel in kürzeren Intervallen (10s). Diese Zeit reichte aus, um das Maximum der durch den Lösungswechsel hervorgerufenen Depolarisation zu überschreiten.

(B) Genauere Untersuchung der Abnahme der Reaktion von V bei geringerem $[\text{Na}^+]$. In dem zweiten Teil des Experiments wurden Na-Konzentrationsänderungen um den Faktor 2 von zunehmend natriumärmeren Präinkubationslösungen aus vorgenommen.

Die Anzahl der untersuchten Zellen ist in Bild 21 angegeben. (Lös.: 1, 2, 3, 13, 14, 15, 16)

Amplitude von ΔV mit abnehmender Na-Konzentration im Präinkubationsmedium ab, obgleich der Quotient der Konzentrationsänderung praktisch konstant blieb. Daraus läßt sich schliessen, daß die in Bild 20(A) beobachtete Sättigung auf geringere Antworten von V im Bereich geringer Na-Konzentrationen zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse dieser Experimentreihe ist in Bild 21 zusammen-

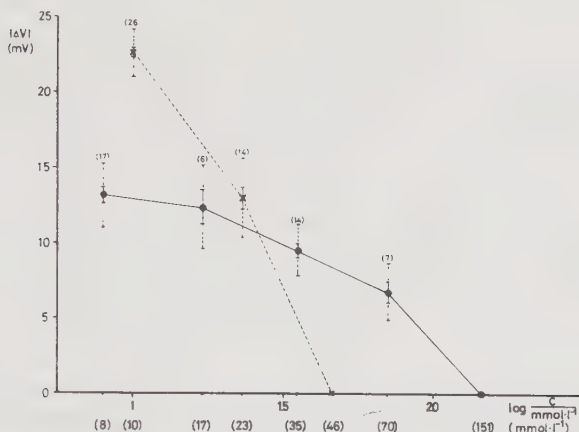


Bild 21: Quantitative Abhängigkeit der V-Änderungen von dem Ausmaß der Konzentrationsänderungen von Na^+ (durch Punkte markiert) und HCO_3^- (Kreuze). Die Konzentrationsänderungen wurden in logarithmischem Maßstab dargestellt. Nur die sofortigen Abstriche nach einem Wechsel zu einer weniger Na oder HCO_3^- enthaltenden Lösung wurden ausgewertet. Die Kreuze geben die Werte für die Bikarbonatreaktion an, die Punkte die der Natriumreaktion. Die durchgezogenen Balken geben SEM an, die gestrichelten SD. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist über jedem Messpunkt angegeben. Die Steigungen der Kurven sind: 43.2 ± 8.9 (SD) mV/Dekade ($n=14$) für Bikarbonat (berechnet aus dem Wechsel 46 zu 23 mM) und 20.3 ± 5.7 (SD) mV/Dekade für Natrium (berechnet aus dem Wechsel 151 zu 70 mM). Berücksichtigung der Diffusionspotentiale (Abschn. 2.5) führt zu einer Steigung von 15.3 mV/Dekade für Natrium und 39.0 mV/Dekade für HCO_3^- .

mengefasst. Die Reaktion auf Bikarbonat kann in der semilogarithmischen Darstellung annähernd durch eine Gerade wiedergegeben werden, während - wie schon für das Einzelexperiment aus Bild 20 beobachtet - die Na-induzierten V-Änderungen mit größeren Konzentrationssprüngen in die Sättigung geht.

Es ist von Interesse, die Steigungen $\Delta V / \Delta \log [\text{HCO}_3^-]$ mit

$\Delta V / \Delta \log[\text{Na}^+]$ an einem Punkt gemeinsamer Konzentrationen miteinander zu vergleichen, da dies Hinweise auf die Stöchiometrie des angenommenen Cotransportes geben könnte. Berechnet man diese Steigungen aus den Antworten auf Änderungen von $[\text{HCO}_3^-]$ von 46 zu 23 mM, und von $[\text{Na}^+]$ von 151 zu 70 mM, so erhält man einen Quotienten beider Steigungen von 2.13 ± 0.23 (Fehlerangabe aus SEM-Werten der Streuung. Wenn diese mit SD angegeben wird, ergibt sich für das Verhältnis der Steigungen ein Fehler von ± 0.64). Berücksichtigt man bei der Auswertung die Diffusionspotentiale zwischen den benutzten Lösungen (siehe Abschnitt 2.5), so ergibt sich ein Verhältnis von 2.55. Diese Werte liegen möglicherweise geringfügig über dem wahren Wert, da die Reaktion auf Na schon in diesem Konzentrationsbereich eher von dem idealen NERNST-schen Verhalten abweicht (auf dieser Idealisierung basiert die Berechnung) als die auf HCO_3^- .

3.10 Wird Li ebenfalls transportiert?

Die Ergebnisse der Untersuchung der Kationenabhängigkeit der Reaktion von V auf Bikarbonat legen die Vermutung nahe, daß auch Lithium durch denselben Cotransportprozess wie Natrium transportiert werden könnte. Wenn dies stimmt, dann sollte - nach entsprechender Inkubation der Zelle mit Li - Ersatz von Li durch Cholin zu einer ähnlichen Depolarisation führen wie sie bei Ersatz von Na durch Cholin beobachtet wurde. Darüber hinaus sollte die Reaktion die gleiche Abhängigkeit von Bikarbonat und Stilbenen aufweisen.

Diese Voraussagen wurden in einer weiteren Reihe von Experimenten überprüft. Eine typische Registrierung ist in Bild 8 gezeigt. Zunächst wurde das extrazelluläre Natrium eine Minute lang hauptsächlich durch Lithium (und 46 mM Cholin, Lösung 8) ersetzt. Dies führte zu einer Depolarisation mit einer anschließenden Hyperpolarisation nach Na-Zugabe. Diese Reaktion ähnelte der bei Ersatz von Na durch Cholin beobachteten. Diese Maßnahme wurde 9 Minuten später an derselben Zelle ebenfalls durchgeführt. Bei Ersatz von Na durch Cholin war die Amplitude von V ungefähr 40 % größer. Dies zeigt, daß Li Natrium eher ersetzen kann als Cholin, was mit den Befunden über

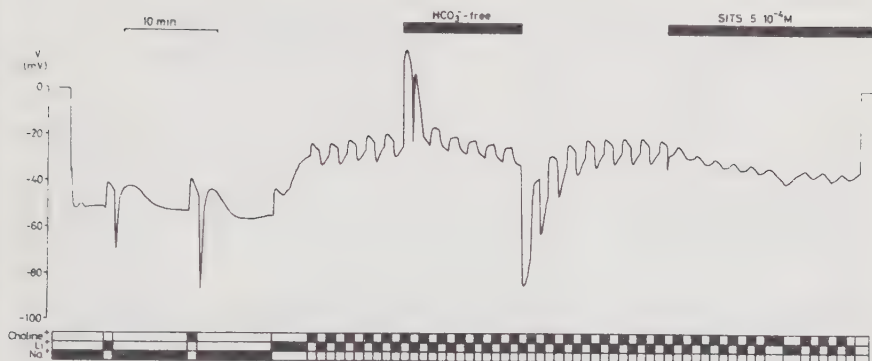


Bild 22: Reaktion von V auf Lithium-Cholin-Ersatz. In nominell bikarbonatfreier Lösung (Balken) drehte sich die Antwort um, und SITS ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) reduzierte sie weitgehend. Ähnliche Reaktionen von V auf Ersatz von Li durch Cholin wurden in 4 Zellen beobachtet. Der Einfluß von bikarbonatfreier Lösung und von SITS auf die Reaktion wurde in 3 Zellen 3 verschiedener Zelllinien untersucht und glich den hier gezeigten. (Lös.: 1, 5, 7, 8, 10, mit entspr. Inhibitoren)

die Kationenabhängigkeit der Reaktion auf Bikarbonat übereinstimmt. Jedoch sind Na und Li in Bezug auf die Reaktion nicht gleichwertig, da sonst nur eine geringe Veränderung von V erkennbar sein sollte (aufgrund des Ersatzes von 46 mM Na durch Cholin).

In dem nächsten Schritt wurde Na für eine längere Zeitdauer durch Li ersetzt. Dies führte zunächst zu der schnellen Depolarisation, die schon früher an derselben Zelle bei Gabe von Li-Ringer beobachtet wurde. Nach einer kurzen Phase einer Repolarisation fiel die Spannung weiter ab und benötigte mehrere Minuten, um einen stabilen Wert zu erreichen. Möglicherweise deutet dies auf eine Inhibition der Na-K-ATPase durch Li hin. Nach dieser Präinkubation mit Lithium wurde periodisch in Abständen von einer Minute Li durch Cholin ersetzt. In Überein-

stimmung mit oben formulierter Hypothese führte dies zu einer Depolarisation, ähnlich wie der bei Cholinersatz von Natrium beobachteten. Die Amplitude der Reaktion war bei dem Li/Cholin-Wechsel jedoch kleiner. Ein jetzt durchgeführter Entzug von Bikarbonat/ CO_2 führte, wie auch schon in Abschnitt 3.7 gezeigt, zu einer Depolarisation. In dieser nominell bikarbonatfreien Lösung drehte sich das Vorzeichen der Spannungsänderung durch Li/Cholin-Wechsel um (was zumindest teilweise auf die Diffusionspotentiale zurückzuführen ist). Dies war reversibel nach erneuter Zugabe von Bikarbonat, die wieder eine Hyperpolarisation hervorrief. Während der ersten Minuten nach Wiedergabe von Bikarbonat war die Reaktion auf Ersatz von Li durch Cholin verstärkt. Als letzter Schritt des Experiments wurde SITS ($5 \cdot 10^{-4}$ M) hinzugegeben. Dies verursachte eine Verringerung der Reaktion mit einer nunmehr sehr langsamen durch Li-Zugabe verursachten Depolarisation.

Zusammenfassend stimmen diese Ergebnisse mit der Hypothese überein, daß in gewisser Masse Li an Stelle von Na mit Bikarbonat elektroten cotransportiert werden kann.

3.11 Einfluss von Amilorid auf das Ruhepotential und die Reaktion auf Na^+ und HCO_3^-

Amilorid in einer Konzentration von 10^{-3} M ließ die Plasmamembran um 8.5 ± 2.6 mV (SD, $n=13$) hyperpolarisieren. Bei der Hälfte der Konzentration ($5 \cdot 10^{-4}$ M) war die Hyperpolarisation etwas geringer (4.3 ± 1.5 mV, $n=8$), während bei 10^{-5} M kaum eine Reaktion bemerkbar war (0.8 ± 0.9 mV, $n=8$).

Der Einfluß von Amilorid (10^{-3} M) auf die Änderung der Membranspannung V unter $[\text{HCO}_3^-]$ - und $[\text{Na}^+]$ -Änderungen wurde gleichfalls untersucht. Ein typisches Experiment ist in Bild 23 abgebildet. Die Badlösung wurde in kurzen Zeiträumen von 10 Sekunden auf Testlösungen umgeschaltet, die 35 bzw. 8 mM Na oder 10 mM HCO_3^- enthielten. Diese Zeit war für das Erreichen des Minimums von V ausreichend. Diese Testpulse wurden in Ab- und Anwesenheit von Amilorid gegeben. Aus Bild 23 ist kein deutlicher Effekt dieses Inhibitors auf die Na- und HCO_3^- -indu-

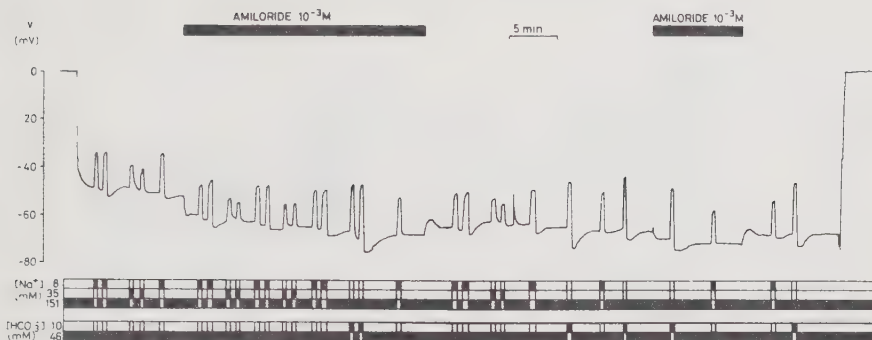


Bild 23: Einfluss von Amilorid (10^{-3}M) auf die Ruhemembranspannung und die Reaktionen auf Na^+ und HCO_3^- . Ähnliche Resultate wurden an 5 anderen Zellen zweier verschiedener Zelllinien erhalten. (Lös.: 1, 3, 14, 16 mit und ohne Amilorid 1 mM)

zierten V-Änderungen zu erkennen. In Bild 25(A) wurden die Daten mehrerer derartiger Experimente zusammengefasst. Man erkennt, daß Amilorid (10^{-3}M) keinen signifikanten Einfluß auf diese Reaktionen besaß.

Wurde hingegen die Bikarbonatkonzentration in längeren Abständen von einer Minute periodisch geändert, so wurde ein Einfluss von Amilorid auf die Reaktion der Membranspannung sichtbar (Bild 24). Die Gesamtamplitude der Reaktion wurde reduziert. Dies war aber nicht eine Folge des sofortigen Auf- oder Abstrichs der Spannung nach einer Konzentrationsänderung, sondern ist vielmehr auf eine Veränderung der Geschwindigkeit zurückzuführen, mit der V nach erfolgter Auslenkung durch Konzentrationsänderungen dem Gleichgewichtspotential wieder zustrebt.

Um diesen Effekt näher zu erfassen, ist es notwendig, den Verlauf der Spannungsänderung näher zu untersuchen. Dazu wurde das Signal in verschiedene Abschnitte unterteilt. Diese sind in Bild 24 (B) erläutert. Es wird unterschieden zwischen der

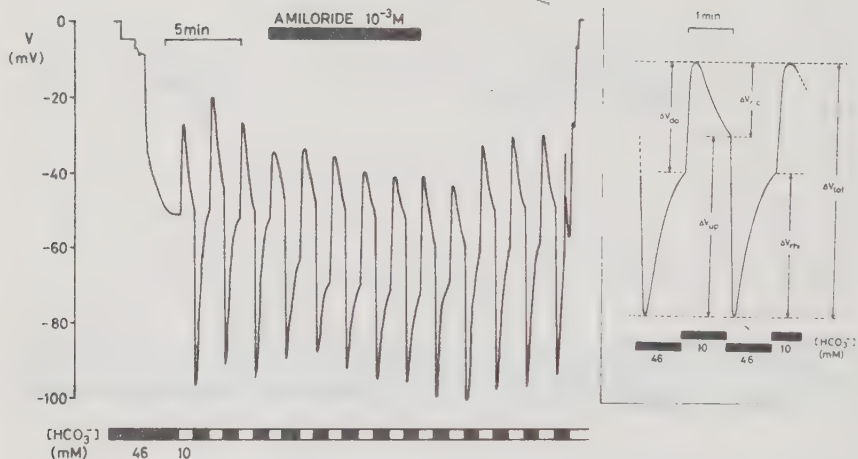


Bild 24: Einfluß von Amilorid (10^{-3} M) auf bikarbonat-induzierte V-Änderungen. Im Gegensatz zu Bild 23 wurde der Konzentrationswechsel in grösseren Zeitabständen vorgenommen. Das gleiche Experiment wurde an vier verschiedenen Zellen durchgeführt, die alle gleiche Resultate ergaben. (Lös.: 1, 3 mit und ohne Amilorid)

Rechter Einsatz: Unterteilung der Spannungsantwort in verschiedene Segmente. Erläuterung im Text.

Totalamplitude ΔV_{tot} , dem direkten Aufstreich ΔV_{up} nach Erhöhung und dem direkten Abstrich ΔV_{do} nach Erniedrigung von $[\text{HCO}_3^-]_o$. Die Rückkehr der Spannung wird (ziemlich willkürlich) durch die Abschnitte ΔV_{rhi} in hoher, und ΔV_{rlo} in niedriger Bikarbonatkonzentration beschrieben.

Das Ergebnis der Auswertung nach diesem Schema ist in Bild 25 (B) dargestellt. Es ist ersichtlich, daß Amilorid auch in dieser hohen Dosis keinen signifikanten Einfluß auf die direkten Reaktionen ΔV_{up} und ΔV_{do} nach Änderung der Bikarbonatkonzentration besitzt. Dies stimmt mit den Ergebnissen des Experiments aus Bild 23 und der Abbildung 25 (A) gut überein. Hingegen ist der Effekt auf die Rückkehr des Potentials in Richtung auf das Gleichgewicht hochsignifikant (Abschnitte ΔV_{rhi}

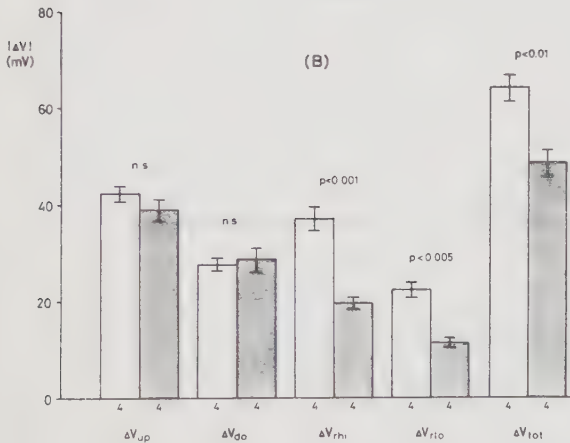
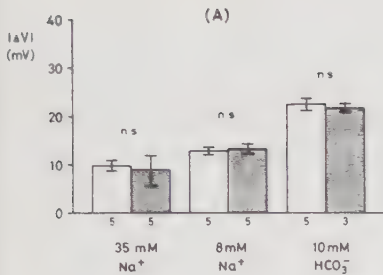


Bild 25: Einfluß von Amilorid (10^{-3}M) auf die Na^+ - und HCO_3^- -induzierten Änderungen von V . Schraffierte Säulen geben die Antwort in Anwesenheit von Amilorid, weiße Säulen die Kontrollen wieder. Die Balken geben SEM an. Die Anzahl der untersuchten Zellen ist unter den Säulen angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe des t-Test's berechnet.

(A) Antwort auf kurze Pulse geringer Na^+ - (35 und 8 mM) und HCO_3^- -Konzentration aus Experimenten ähnlich wie in Bild 23. Nur die Depolarisation wurde berücksichtigt.

(B) Reaktion auf 1-minütigen Wechsel zwischen 46 und 10 mM HCO_3^- wie in Bild 24. Der Spannungsverlauf wurde in verschiedene Segmente unterteilt, die in Bild 24 (A) und im Text erklärt sind.

und ΔV_{rl0}). Die Veränderung dieser Abschnitte führt zwangsläufig auch zu einer Veränderung der Totalamplitude ΔV_{tot} .

Diese Experimente legen den Schluss nahe, daß Amilorid (10^{-3}M) keinen direkten Einfluß auf den postulierten $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Co-transport besitzt, sondern indirekt über andere Prozesse die Rückkehr der Membranspannung in Richtung auf das Gleichgewichtspotential nach Aufbau von transmembranalen Bikarbonat-

gradienten beeinflusst.

3.12 Einfluß von Ouabain

Die Zugabe von Ouabain in einer Konzentration von 10^{-4} M verursachte innerhalb weniger Sekunden einen Abfall der Ruhemembranspannung um ungefähr 7 mV (Bild 26). Dies deutet auf die sofortige Ausschaltung des elektrogenen Pumpvorgangs der Na/K-ATPase hin, während der darauf folgende, sich über mehr

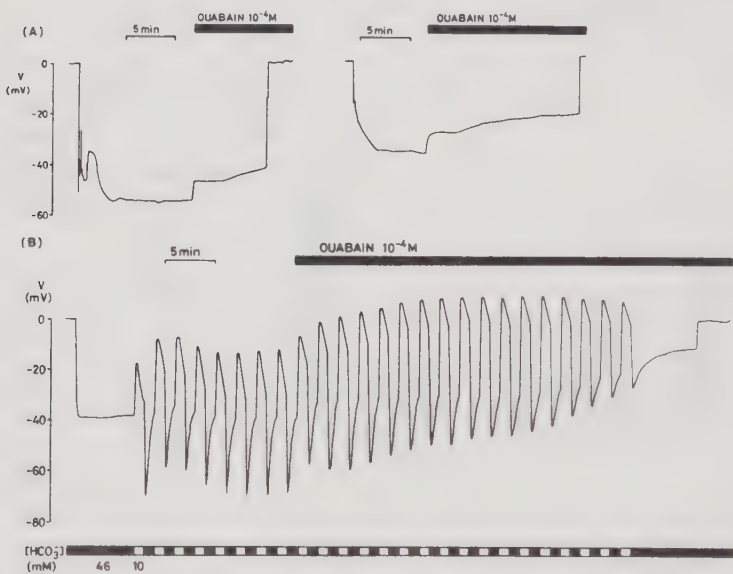


Bild 26: Wirkung von Ouabain (10^{-4} M). (a) Einfluss auf die Gleichgewichtsspannung zweier Zellen. Beachte die schnelle Verringerung von V innerhalb von Sekunden und den darauf folgenden langsamen weiteren Abfall. Ein ähnlicher Effekt von Ouabain (10^{-4} M) wurde an 4 Zellen dreier unterschiedlicher Zelllinien beobachtet, und von 10^{-5} M an 4 Zellen zweier Zelllinien.

(b) Einfluss von 10^{-4} M Ouabain auf die bikarbonat-induzierte V-Änderung. Ähnliche Resultate wurden mit vier Zellen zweier verschiedener Zelllinien erhalten. (Lös.: 1, 3)

als eine halbe Stunde hinziehende langsame weitere Abfall durch den Abbau des Kaliumgradienten über die Membran zu erklären sein sollte.

Bei einer Konzentration von 10^{-4} M depolarisierten die Zellen innerhalb von 30 s um -6.8 ± 1.09 mV (SD, n=4). Diese Zellen hatten eine Ruhespannung $V = -45.03 \pm 8.75$ mV. 10^{-5} M Ouabain verursachte eine Depolarisation um -5.12 ± 0.87 mV (SD, n=5, Ruhespannung $V = -44.8 \pm 4.2$ mV).

Die bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen wurden im wesentlichen durch Ouabain nicht beeinflusst, wie dies in Bild 26 (B) gezeigt wird. Nach einer Latenz von einigen Minuten nach Applikation von Ouabain wurde die Reaktion eher etwas grösser als kleiner. Die Form des Spannungsverlaufes wurde symmetrischer. Die Hyperpolarisation nach Erhöhung der Bikarbonatkonzentration war nicht mehr wesentlich größer als die durch Erniedrigung dieser Konzentration hervorgerufene Depolarisation. Nach mehr als 20 min begann die Antwort zunehmend schwächer zu werden.

4. Diskussion

4.1 Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation

Die Zellkultur ist eine elegante Methode, große Mengen von Zellen einer einheitlichen Population dem Experimentator zur Verfügung zu stellen. Andererseits lassen sich Säugetierzellkulturen nicht transformierter Zellen (cell strain) nur über eine begrenzte Anzahl von Generationen weiterzüchten, die unter anderem von der Spezies, dem Gewebe und den Kulturbedingungen abhängig ist. Während der Züchtung der Zellen kommt es im allgemeinen zu einer fortlaufenden Veränderung der Zellen, die schließlich (ohne eventuell erfolgende spontane Transformation, die zu unsterblichen Zelllinien (cell line) führen kann) zum Stillstand des Wachstums und Aussterben der Zelllinie führen.

Um derartige Veränderungen, die sich möglicherweise auch in Transporteigenschaften der Zellen äussern können, zu minimieren, wurden in dieser Arbeit nur frühe Passagen, die durch einen geringen Aufteilungsgrad bei der Weiterzucht (split ratio) gewonnen wurden, verwendet. Bei der maximalen Passagezahl von 5, einem (meist unterschrittenem) split ratio von 4 und einer angenommenen Überlebensrate von 50% bei der Ablösung durch Trypsinierung ergibt sich somit eine Zahl von 15 Generationen von der Trypsinierung der ersten konfluenten Flasche an. Nimmt man an, daß von den von der Rindercornea ($A=1\text{cm}^2$) abgelösten Zellen nur 10% in der Kultur weiterwachsen, so ergibt sich bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers in einer 25 cm^2 großen Kulturflasche noch einmal eine Generationszahl von ca. 8, so daß die in dieser Arbeit punktierten Zellen maximal 25 Zellteilungen nach Entnahme aus dem Auge durchlaufen haben.

Cornea-Endothelzellen vom Rind lassen sich nach Angaben der Gruppe um Gospodarowicz in Anwesenheit von FGF (Fibroblast Growth Factor) über mehr als 200 Generationen in Kultur ziehen, ohne ihre (morphologischen) Eigenschaften wesentlich zu verändern (30). Während FGF bei geringer Aussaatdichte der Zellen notwendig ist (29, 30), sind unsere Erfahrungen in

Einklang mit der Arbeit von MacCallum et al. (66), die bei einem geringen split ratio von 1:2 bis 1:4 ein gutes Verhalten in Kultur bis mindestens zur fünften Passage finden, ohne daß FGF dazu notwendig wäre.

Unsere eigenen Erfahrungen haben ergeben, daß - in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten - die Grösse der Zellen langsam mit der Passagezahl zunimmt, und dies offensichtlich um so schneller, je größer das split ratio gewählt wurde. In einigen Fällen konnte ein praktischer Stillstand des Wachstums mit sehr großen Zellen in der sechsten Passage bei einem split ratio von 1:8 beobachtet werden. Derartige Zellen wurden jedoch nicht punktiert. Aus den elektrophysiologischen Ergebnissen ergab sich der Eindruck, daß die V-Änderungen auf Bikarbonat oder Natrium mit zunehmender Passagezahl geringer wurden. Daher wurden, wie oben beschrieben, für die hier referierten Untersuchungen nur möglichst junge Zellen verwendet. Um Artefakte durch interindividuelle Variationen zu vermeiden, benutzten wir Zelllinien von mehr als 20 verschiedenen Rinderaugen, die alle ähnliche Resultate lieferten.

Das hauptsächliche Argument für eine gute Übertragbarkeit der hier erhobenen Daten auf die *in vivo* Situation liefert die weitgehende (morphologische) Übereinstimmung des *in vitro* mit dem *in vivo* System. Corneaendothelzellen vom Rind sind ein sehr gut untersuchtes *in vitro* System, was die Morphologie und Biochemie anbetrifft. Sie lassen sich problemlos auf Plastikoberflächen züchten und behalten weitgehend ihre morphologischen Eigenarten und ihre Syntheseeigenschaften. Sie bilden einen kontaktinhibierten Monolayer hexagonaler Zellen, die mit Haftstellen untereinander verbunden sind, die den *in vivo* vorhandenen weitgehend ähneln (30). Sie synthetisieren - analog zur Synthese der Descemet'schen Membran *in vivo* - eine Basalmembran, die sie auf die Plastikunterlage abscheiden (28, 29, 30, 66). Diese Membran enthält alle typischen Bestandteile einer Basalmembran wie Fibronectin, Laminin und mehrere Kollagentypen. Diese Basalmembran wurde auch als Untergrund zum Anzüchten von Corneaendothelzellen und anderen Zelltypen benutzt (28, 70, 55).

Aufgrund dieser Eigenschaften scheinen die bovinen Corneaendothelzellen ein besonders günstiges System zu sein, das sich von den *in vivo* Eigenschaften des Endothels nur wenig unterscheidet (28).

4.2 Intrazelluläre Potentiale

In situ ist die Punktion der Cornea-Endothelzellen - wohl aufgrund ihrer geringen Größe - sehr schwierig. Daher liegen nur sehr wenige Arbeiten vor, in denen Zellpotentiale auch nur über kurze Zeiträume abgeleitet werden konnten (97, 59, 60, 48). Diese Zeiten reichten nicht aus, während der Punktion Lösungswechsel an den Zellen durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß im Gegensatz dazu mit kultivierten Rindercorneaendothelzellen Ableitungen zu erhalten sind, die bis zu mehreren Stunden stabil sind und es dadurch dem Experimentator erlauben, eine große Anzahl von Lösungswechseln während der Registrierung der Membranspannung einer einzigen Zelle durchzuführen.

Die Hauptgründe für diesen Erfolg sind meines Erachtens folgende:

- (a) Zellen, die auf Plastik kultiviert werden, sind mechanisch stabiler als *in situ* (*). Mit der beschriebenen Punktionsmethode, bei der die Mikroelektrode in einem flachen Winkel auf dem Boden der Schale bis zur Punktion einer Zelle weitergeschoben wird, ist die Elektrode durch Aufliegen auf dem Boden der Schale in unmittelbarer Nähe der Zelle mechanisch fixiert.
- (b) Corneaendothelzellen vom Rind sind in der Kultur (wenn sie ohne hohe Konzentrationen von FGF gezüchtet werden) etwas größer als *in situ* (29, 30), und
- (c) ist es möglich, mit einer einzigen Elektrode durch einfaches Voranschieben auf dem Boden eine große Anzahl von Zellen ohne einen Wechsel der Elektrode zu punktieren. Dagegen brechen die Spitzen von Mikroelektroden sehr leicht ab, sobald

(*) Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Punktion von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen beschrieben (85). Die Stabilität der intrazellulären Ableitungen konnte hierbei durch eine verbesserte Haftung der Zellen auf dem Untergrund, die durch La^{3+} vermittelt wurde, erhöht werden.

sie in die unmittelbar unter der Endothelschicht gelegenen Descemet'sche Membran eindringen. Somit ist es in unserem Fall viel leichter, durch wiederholte Punktion eine stabile Ableitung zu erhalten.

Der Mißerfolg von Jumblatt (48), der auch mit kultivierten Zellen arbeitete, über längere Zeit stabile Ableitungen zu erhalten, liegt nach seiner eigenen Aussage an dem von ihm benutzten Aufbau, der nicht vibrationsfrei war.

Die Membranspannung V im Gleichgewicht betrug in dieser Arbeit im Mittel um -46 mV, wobei die Daten hauptsächlich in einem Bereich von -40 bis -55 mV lagen. In einigen wenigen Fällen wurden auch Spannungen bis zu -80 mV gemessen. Die Größe der hier gemessenen Werte von V stimmt mit den publizierten Daten, die an Kaninchen- bzw. menschlicher Cornea erhoben wurden, gut überein. So berichteten Wiederholt und Koch (97) für die Kaninchencornea Werte von -30.6 mV, Streubereich -7 bis -93 mV, Lim und Fischbarg (59) -45 ± 2 mV und in einer neueren Arbeit (60) -61 ± 1 mV. Jumblatt (48), der mit kultivierten Corneaendothelzellen vom Kaninchen arbeitete, erhielt Spannungen um -59.2 ± 1.8 mV. In den meisten dieser Arbeiten ist die Streuung der Daten erheblich, so daß man die Mittelwerte nur mit großer Vorsicht betrachten sollte.

Die Aussagen dieser Arbeit wurden allein durch intrazelluläre Potentialmessungen mit Mikroelektroden gewonnen. Mehrere Gruppen haben die Problematik dieser Methode untersucht und diskutiert (7, 22, 74). Aus mit KCl gefüllten Mikroelektroden können Kalium und Chlorid durch Diffusion und aufgrund des hydrostatischen Druckes in das Zytoplasma der Zellen gelangen, wobei die intrazelluläre Konzentration dieser Ionen insbesondere bei kleinen Zellen merklich ansteigen kann. Dies kann die Spannung über die Plasmamembran sowie andere Eigenschaften der Zelle ändern. Bei verschiedenen Zelltypen (7, 74) wurde in der Tat eine Veränderung der Zellen beobachtet. Bei jenen Messungen (7, 74) waren die Elektroden mit $1M$ bzw. $3M$ KCl gefüllt.

Da diese Artefakte von der Elektrodenöffnung (Elektrodenwiderstand) und der Salzkonzentration abhängig sind, wurde in

dieser Arbeit mit einer KCl-Konzentration von 0.5 M und einem relativ hohen Elektrodenwiderstand von 70 - 140 MOhm gearbeitet. Trotzdem sollte selbst bei diesen Werten der KCl-Einstrom in die Zellen erheblich sein (22). Es ist möglich, daß in vielen Fällen die einströmenden Ionen die Zellen über interzelluläre Kontakte in die Nachbarzellen diffundieren und somit die Auswirkung des Ioneneinstroms geringer wird (22). Dies könnte die in vielen Fällen über lange Zeiträume stabilen Messwerte von Membranspannungen erklären (22).

In vorliegender Arbeit stieg häufig die gemessene Spannung nach der Punktion einer Zelle über einen Zeitraum von mehreren Minuten an, was prinzipiell mit einer Erhöhung von $[K^+]_i$ erklärbar wäre. Dieses Verhalten wurde jedoch auch bei Punktationen mit NaCl-gefüllten Elektroden beobachtet. Zellpunktationen mit NaCl-gefüllten Elektroden liessen keinen Unterschied zu den restlichen Punktionsergebnissen erkennen. Häufig wurden auch Zellen punktiert, die unmittelbar nach der Punktion sogleich ihr endgültiges Potential erreichten. Daher ist anzunehmen, daß der langsame anfängliche Anstieg von V auf eine Abdichtung der Elektrode in der Plasmamembran zurückzuführen ist und daß eine grobe Beeinflussung der Meßergebnisse durch die Punktionsmethode eher unwahrscheinlich ist.

Die in dieser Arbeit benutzte Punktionstechnik ist relativ unkonventionell. Obwohl die Elektrode auf der Plastikoberfläche der Gewebekulturschale vorgeschoben wird, ist ihre eigentliche Spitze nicht in Kontakt mit dem Kunststoff. Dies liegt an der konischen Form des Schaftes. Glitte die Spitze auf der Plastikoberfläche, so könnten keine Zellen punktiert werden, da diese durch die von ihnen produzierte Extrazellulärmatrix (Dicke ca. 0.5 - 2 μm) von der Plastikoberfläche abgehoben werden. Daher sind keine piezoelektrischen Artefakte (außer denjenigen, die eventuell auch bei anderen Punktionsmethoden auftreten) zu erwarten.

4.3 Lokalisation der Membranprozesse

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Punktionsmethode ist es leider unmöglich, aus den beobachteten elektrischen Phänomenen Rückschlüsse auf die Lokalisation der entsprechenden Prozesse, insbesondere die Lage entweder in der apikalen oder der basolateralen Membran, zu ziehen. Da die Zellen einen polarisierten Monolayer, mit einer nach unten sezernierten Basalmembran, bilden, ist es sicherlich die apikale Membran, an der der Lösungswechsel sich am schnellsten vollzieht. Mit Zellen, die auf einer Plastikunterlage kultiviert werden, ist es unmöglich, die basolaterale Membran getrennt zu perfundieren. Zöge man die Zellen auf einem permeablen Untergrund wie beispielsweise einer Kollagenmembran oder einem Milliporefilter, so wäre dies möglich. In diesen Fällen ist es jedoch zu erwarten, daß sich die Punktion schwieriger gestaltet.

Andererseits ist das Corneaendothel ein undichtetes Epithel mit einem transepithelialen Widerstand von $20 - 70 \text{ Ohm cm}^2$ (37, 60), dessen Interzellularspalten für Ionen (61) und auch Moleküle großen Molekulargewichts (52) permeabel sind. Daher kann man erwarten, daß bei einem Lösungswechsel die Ionen auch die basolaterale Seite der Zelle erreichen. Außerdem punktieren wir die Zellen durch Verschieben der Elektrode eher von der basolateralen als von der apikalen Seite her. Durch Zerreißen der Plasmamembran der vorangegangenen Zelle schaffen wir somit wahrscheinlich einen zusätzlichen Zugang der Lösung zur lateralen Plasmamembran. Wir müssen daher annehmen, daß sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran lokalisierte Prozesse zu den beobachteten Reaktionen von V beitragen.

Analogieschlüsse zu anderen Epithelien und die Kenntnis der Richtung des Ionentransportes erlauben es dennoch in dieser Arbeit, Rückschlüsse auf die Lokalisation der Prozesse zu ziehen.

4.4 Einfluß von Bikarbonat, CO_2 und pH auf das Membranpotential

Da das Endothel der Cornea bekanntermaßen Bikarbonat transportiert, wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe intrazellulärer Potentialmessungen die elementaren Schritte dieses Transportprozesses aufzuklären. Weil die Bikarbonatkonzentration, der pH und der pCO_2 miteinander über physikalische Gesetzmäßigkeiten gekoppelt sind, ist es zu erwarten, daß bei einem Einfluß eines dieser Parameter auf die Membranspannung auch die anderen beiden V beeinflussen. In der Tat wurden sowohl bei Änderung der Bikarbonatkonzentration, des extra- und intrazellulären pH und des CO_2 -Druckes Spannungsänderungen über der Plasmamembran gemessen. Da Spannungsänderungen über biologische Membranen im allgemeinen durch Ionenfluxe verursacht sind, warf dies die Frage auf, welche Ionenspezies direkt für die Entstehung dieser Spannungsänderungen verantwortlich ist.

4.4.1 Beeinflussung der Kaliumleitfähigkeit durch Bikarbonat

Bei tierischen Zellen ist die Membranspannung zum grossen Teil durch ein Kaliumdiffusionspotential gegeben. Die Na^+/K^+ -ATPase erzeugt durch einwärts gerichteten Kaliumtransport einen transmembranalen Gradienten, der über eine spezifische K-Leitfähigkeit in der Membran die Spannung generiert. Von vielen Systemen her ist bekannt, daß sich diese Kaliumleitfähigkeit durch Änderungen des pH beeinflussen lässt (6, 80, 86). Daher lag es nahe, den Anteil der Kaliumleitfähigkeitsänderungen an den bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen zu untersuchen.

Dies wurde getan, indem einerseits das Ausmaß der durch kurze Erhöhungen der extrazellulären K-Konzentration hervorgerufenen Depolarisationen in An- und Abwesenheit von Bikarbonat bestimmt wurde, und andererseits die Kaliumleitfähigkeit der Membran blockiert wurde und die Spannungsantwort auf Bikarbonat unter Blockade des Kaliumkanals mit der ohne Blockade verglichen wurde. Diese Blockade wurde mit Barium durchgeführt, dem an vielen Zelltypen eine derartige Wirkung zugeschrieben

wird (6, 32, 73, 93).

Dabei ergab sich, daß nach Entzug von Bikarbonat die durch Kalium hervorgerufenen Depolarisationen signifikant geringer wurden, was als Ausdruck einer verringerten Kaliumleitfähigkeit in dem bikarbonatfreien System gedeutet werden kann. Dies könnte bedeuten, daß die nach Bikarbonatentzug beobachtete Gleichgewichtsdepolarisation (Bild 3, Pfeil) auf eine Verringerung der Kaliumleitfähigkeit zurückführbar ist. Der kausale Zusammenhang ist jedoch nicht gesichert. Es könnte ebenfalls sein, daß eine (wie auch immer produzierte) Depolarisation die (in diesem Fall spannungsabhängige) Kaliumleitfähigkeit vermindert. Andererseits wurde gezeigt, daß in Anwesenheit von Barium die Gleichgewichtsdepolarisation der Zelle durch Bikarbonatentzug vermindert war. Dies ist ein direkterer Hinweis, daß eine Verringerung der Kaliumleitfähigkeit die Gleichgewichtsdepolarisation verursacht. Andererseits war hier durch Barium die Zelle stark depolarisiert, was seinerseits einen Einfluß auf die unter Bikarbonatentzug beobachtete Depolarisation haben könnte. Da an anderen Systemen eine Verminderung der Kaliumleitfähigkeit durch eine Ansäuerung - sei es intra- oder extrazellulär - beschrieben wurde (80), ist möglicherweise auch in bikarbonatfreier Lösung ein verminderter intrazellulärer pH für den Effekt verantwortlich.

Andererseits konnten die schnellen vorübergehenden Depolarisationen, die durch Bikarbonatentzug oder -zugabe hervorgerufen wurden, durch Barium nicht unterdrückt werden. Daraus ist zu folgern, daß andere Ionenspezies für die Erzeugung dieser Spannungsänderungen verantwortlich sind. In dem Experiment aus Bild 7 war die Depolarisation nach Bikarbonatentzug leicht reduziert, während die Hyperpolarisation durch Bikarbonatzugabe in Gegenwart von Barium etwas verstärkt war. Da wohl in den meisten Zellen die Leitfähigkeit für Kalium die quantitativ bedeutendste ist, sollten bei Hemmung dieser Leitfähigkeit die elektrischen Effekte anderer paralleler Prozesse relativ verstärkt werden. Wenn die bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen durch andere Ionen als Kalium erzeugt werden, so sollten sie folglich in Anwesenheit von Barium eher verstärkt

sein. Die geringfügige Verminderung der Depolarisation nach Bikarbonatentzug in der Gegenwart von Barium ist möglicherweise auf die durch Barium hervorgerufene Verminderung der Membranspannung zurückzuführen. Dies würde zu einer Verminderung des elektrochemischen Gradienten für den Einstrom von negativ geladenen Ionen wie z.B. HCO_3^- führen, die möglicherweise für diese Signale verantwortlich sind.

Zusammenfassend, ist möglicherweise eine Verminderung der Kaliumleitfähigkeit für die Gleichgewichtsdepolarisation in bikarbonatfreier Lösung verantwortlich. Dies kann aber nicht als gesichert gelten. Die schnellen vorübergehenden Spannungsantworten auf Änderungen der Bikarbonatkonzentration können jedoch durch eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit nicht erklärt werden.

4.4.2 Hinweise auf einen elektrogenen Bikarbonattransport

Die Experimente legen nahe, daß OH^- , H^+ oder insbesondere HCO_3^- für die vorübergehenden Spannungsänderungen nach Änderungen der Bikarbonatkonzentration verantwortlich sind. Die innerhalb der Fehlergrenzen lineare Abhängigkeit der Spannungsänderungen von dem Logarithmus der Grösse der $[\text{HCO}_3^-]_0$ -Änderung spricht für das Vorhandensein einer Bikarbonatleitfähigkeit. Bei konstantem pCO_2 betrug die Steilheit der Abhängigkeit ungefähr 37 mV/Dekade Bikarbonat (*), während in denjenigen Experimenten, in denen die Lösung, die weniger Bikarbonat enthielt, mit Luft begast wurde, eine grössere Steigung von 64 mV/Dekade erhalten wurde. Dieser zweite Wert liegt geringfügig über der nach der NERNST-Gleichung zu erwartenden Grösse, während die erste gut durch eine Bikarbonatleitfähigkeit, deren elektrischer Effekt durch parallel existierende Leitfähigkei-

(*)Bei diesen Werten wurden die Diffusionspotentiale (s. Abschn. 2.5) nicht berücksichtigt. - In den späteren Experimenten, die in Bild 21 ausgewertet wurden, betrug die Steilheit 43.2 ± 8.9 mV/Dekade, was mit den hier angegebenen 37.3 ± 9 mV/Dekade innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmt. Der etwas höhere Wert bei den neueren Versuchen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß im Verlauf der Arbeit zunehmend jüngere Zellen für die Untersuchungen benutzt wurden.

ten für andere Ionen abgeschwächt ist, erklärt werden könnte. Die steilere Abhängigkeit im zweiten Fall könnte durch die gleichzeitig erfolgende Änderung des $p\text{CO}_2$ erklärt werden. Kohlendioxid, ein kleines elektrisch neutrales Molekül, kann leicht die Lipidbarriere der Plasmamembran der Zelle überqueren (35). In der Zelle sollte es - durch die Carboanhydrase katalysiert - mit Wasser zu Kohlensäure reagieren, die den intrazellulären pH erniedrigt. Eine derartige intrazelluläre Ansäuerung durch Gabe von CO_2 wurde auch direkt durch pH-empfindliche Mikroelektroden an anderen Zellen demonstriert (10). Diese Absenkung von pH_i könnte einen elektrogenen Einstrom von HCO_3^- oder ähnlichen Ionen erzeugen, der eine Hyperpolarisation hervorrufen würde. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß in der Tat eine intrazelluläre Ansäuerung, die mit verschiedenen Methoden herbeigeführt wurde (extrazelluläre Konzentrationsänderungen von Butyrat, Glycodiazin und Ammonium), eine Hyperpolarisation verursachte. Dieser Effekt von $p\text{CO}_2$ wurde auch direkt bei konstant bleibender extrazellulärer Bikarbonatkonzentration demonstriert. Die anfängliche Depolarisation, die nach Erhöhung des $p\text{CO}_2$ beobachtet wurde, könnte vielleicht auf einen zuerst erfolgenden Efflux von HCO_3^- , das schnell durch die intrazelluläre Carboanhydrase gebildet wird, zurückgeführt werden. Die Ursache für das allmähliche Verschwinden dieser Depolarisation ist jedoch unklar.

Bei den meisten Lösungswechseln des Experiments aus Bild 4 wurde der extrazelluläre pH ebenfalls geändert. Daher muß man den Einfluß des extrazellulären pH bei diesem Experiment mitberücksichtigen. Aus dem Experiment geht hervor, daß pH_o zumindest nicht der wichtigste Faktor ist, der V bestimmt, und dies aus folgenden Gründen:

- (i) Die grössten Änderungen von V wurde beobachtet, wenn die $[\text{HCO}_3^-]$ -Änderung am grössten war, und dies wurde bei einer nur geringen Veränderung von pH_o (7.66 zu 7.5) durchgeführt,
- (ii) In diesem Experiment war die Richtung der Spannungsänderung nicht mit der pH_o -Änderung korreliert. In Teil (a) und (b) des Versuchs aus Bild 4 führten die alkalischeren Lösungen (die mehr HCO_3^- enthielten) zu einer Hyperpolarisation, während

in Teil (c) die alkalischere Lösung (die weniger CO_2 enthielt) zu einer Depolarisation führte.

Diese Versuche weisen also darauf hin, daß Bikarbonationen direkt für die Spannungsänderungen verantwortlich sind. Änderungen des pCO_2 erzeugen Spannungsänderungen wahrscheinlich sekundär über die Schaffung von transmembranalen Bikarbonat- und pH-Gradienten.

Andererseits konnten Änderungen der Spannung auch in nominell bikarbonat-freier Lösung durch Änderungen des pH erzielt werden. Sowohl intra- als auch extrazelluläre Veränderungen des pH ergaben Spannungsantworten, die auf einen Einfluß des transmembranalen pH-Gradienten auf die Membranspannung schliessen lassen. Obwohl diese Versuche in nominell bikarbonatfreier Lösung vorgenommen wurden, kann dies nicht als Beweis einer H^+ oder OH^- -Leitfähigkeit gedeutet werden. In nominell bikarbonatfreien Lösungen, die mit Luft äquilibriert sind, ist nämlich die Bikarbonatkonzentration bei physiologischem pH immer noch um mehr als einen Faktor 100 größer als die H^+ oder OH^- -Konzentration (44). Durch den aeroben Stoffwechsel der Zelle fällt außerdem weiteres CO_2 an. Zudem bewirkte Methazolamid, ein Inhibitor der Carboanhydrase, auch in nominell bikarbonatfreier Lösung eine Reduktion der Spannungsantwort auf pH_i -Änderungen (Bild 14). Dies kann am leichtesten dadurch interpretiert werden, daß es Bikarbonationen sind, die durch elektrogenes Durchdringen der Plasmamembran auch die Spannungsreaktionen auf pH-Änderungen erzeugen.

4.4.3 Der Einfluß von Methazolamid und Stilbenderivaten auf die Bikarbonat- und pH-Reaktion

Sowohl Methazolamid (10^{-4} M) als auch die Stilbenderivate SITS und DIDS ($> 10^{-4}$ M) reduzierten die Spannungsantwort auf Bikarbonat/ CO_2 . Ihre Wirkungen waren additiv, was auf unterschiedliche Angriffspunkte der beiden Inhibitoren schliessen läßt.

Methazolamid ist ein Inhibitor der Carboanhydrase, der aufgrund seiner besseren Lipidlöslichkeit leichter in Zellen

eindringt als das bekanntere Acetazolamid (68, 69). In Cornea-endothelzellen wurde von verschiedenen Gruppen das Enzym Carboanhydrase mit histochemischen Methoden nachgewiesen (38, 63, 65). Inhibitoren der Carboanhydrase wie Methazolamid oder Ethoxylzolamid bewirkten in transepithelialen Messungen eine Verminderung des Kurzschlußstroms und der transepithelialen Spannung (20, 38). Es erscheint wahrscheinlich, daß auch bei den hier vorgestellten Messungen Methazolamid seine Wirkung durch die Inhibition der Carboanhydrase ausübt. Nimmt man einen elektrogenen Transportschritt für Bikarbonationen an, so ist dies bei Änderungen des $p\text{CO}_2$, der parallel zu den Bikarbonatkonzentrationsänderungen vorgenommen wurde, verständlich, da die Umwandlung von CO_2 zu Bikarbonat in durch das Enzym um mehrere Größenordnungen beschleunigt wird. Aber auch bei Änderung von $[\text{HCO}_3^-]_0$ bei konstantem $p\text{CO}_2$ sollte die Carboanhydrase die Reaktion erleichtern, indem es die Diffusion von HCO_3^- innerhalb der Zelle beschleunigt. Dieser Effekt beruht darauf, daß CO_2 leichter als HCO_3^- in Lösung diffundiert und somit die fortgesetzte zytoplasmatische Umwandlung dieser beiden Spezies ineinander die Diffusion beider Moleküle erleichtert. Eine enge Analogie besteht zu den Ergebnissen von Frömter et al. (25, 24) an Zellen des proximalen Tubulus der Rattenniere. Die basolaterale Membran dieser Zellen reagiert ähnlich wie hier für die Cornea beschrieben mit Spannungsänderungen auf $[\text{HCO}_3^-]$. Diese Spannungsänderungen sind ebenfalls eine logarithmische Funktion der Bikarbonatkonzentration und können gleichfalls durch einen Inhibitor der Carboanhydrase (Acetazolamid) abgeschwächt werden. Frömter et al. (25) interpretierten dies aber bevorzugt entweder als einen direkten Effekt auf eine basolaterale Bikarbonatleitfähigkeit oder als Hinweis auf eine OH^- -Leitfähigkeit, bei der Bikarbonat erst in der Zelle zu OH^- durch die Carboanhydrase umgewandelt werden muß, bevor es die elektrischen Erscheinungen hervorruft.

SITS (4-acetoamido-4'-isothiocyano-2,2'-disulfonsäure-Stilben) ist ein Stilbenderivat, das zuerst von Maddy (67) zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Membranproteinen an Erythrozyten synthetisiert wurde. Später wurde bekannt, daß diese

Substanz spezifisch die Anionenpermeabilität der Erythrozyten hemmt (53, 15) und es wurde eine große Anzahl analoger Verbindungen synthetisiert, um die Anionentransportstelle näher zu charakterisieren. Der Anionenaustauscher der Erythrozyten, der chemisch mit dem sogenannten Band 3 Protein identifiziert wurde, vermittelt einen elektroneutralen Austausch verschiedener Anionen (14, 64). Der physiologisch wichtigste Austausch ist dabei der von Cl^- gegen Bikarbonat, der zum Transport von CO_2 durch das Blut von entscheidender Bedeutung ist. Gleichzeitig vermittelt wahrscheinlich der gleiche Transporter einen elektrogenen, ebenfalls Stilben-inhibierbaren transmembranalen Transport von Anionen, dessen Transportraten allerdings um Größenordnungen unterhalb derer des elektroneutralen Austausches liegen.

Auch an anderen Zellen haben die Stilbenderivate SITS und DIDS sich als sehr nützlich für die Untersuchung von Anionentransportvorgängen erwiesen. Sie inhibieren dort sowohl elektroneutrale Austauschprozesse, als auch elektrogene Transportschritte, an denen neben Anionen teilweise auch Natriumionen beteiligt sind (14, 64, 80).

Wie aus dieser Arbeit hervorgeht, inhibieren an Corneaendothelzellen SITS und DIDS die elektrische Antwort der Zellmembran auf Änderungen der Bikarbonatkonzentration um ca. 50%. Der inhibierte Prozess kann somit kein elektroneutraler Austauschprozeß sein. In diesem hypothetischen Fall sollte die Reaktion eher verstärkt sein, da dann ein elektroneutraler Weg zum Ausgleich der transmembranalen Bikarbonatgradienten wegfiel und HCO_3^- allein über den elektrogenen Kanal, der die beobachteten Spannungsänderungen erzeugt, fließen müsste.

Um die folgende Diskussion zu erleichtern, erscheint es sinnvoll, jetzt zunächst ein Modell für diesen elektrogenen Bikarbonattransporter zu postulieren und dieses danach anhand der vorgestellten Daten zu überprüfen.

4.5 Modell: gekoppelter elektrogener Transport von Natrium und Bikarbonat

Obwohl in dieser Arbeit keine Ionentransportraten gemessen wurden - wie z.B. direkt durch Isotopenfluxbestimmungen oder indirekt über zeitliche Verläufe von intrazellulären Ionenaktivitäten - und ich daher auf die Interpretation nur eines gemessenen Parameters, nämlich der Zellmembranspannung V , angewiesen bin, möchte ich dennoch zur Erklärung der Daten ein Transportmodell vorstellen.

Es besteht aus einem eng gekoppelten Transportmechanismus für Bikarbonat und Natrium, der nettomässig negative Ladung in die Transportrichtung beider Ionen verschiebt und durch Inhibitoren des Anionentransportes wie SITS oder DIDS hemmbar ist.

Dieses Modell macht mehrere Voraussagen über die Membranspannung V , die in dieser Arbeit überprüft wurden. Die wichtigsten dieser Voraussagen sind:

(a) Sowohl Verringerung der extrazellulären Bikarbonat- als auch der Natriumkonzentration führen zu einer Depolarisation von V , weil durch den gekoppelten Ausstrom von Natrium und Bikarbonat nettomässig negative Ladung die Zelle verläßt. Das Ausmaß dieser Depolarisation nimmt mit dem Ausmaß der Konzentrationsänderung stetig zu. Wiederzugabe von Bikarbonat oder Natrium verursacht eine Hyperpolarisation, die mit der Präinkubationszeit in HCO_3^- - oder Na^+ -freiem Medium zunimmt (da dann der Gradient für den elektrogenen Einstrom von Bikarbonat und Natrium aufgrund der zunehmend verringerten intrazellulären Konzentration dieser Ionen zugenommen hat).

(b) Die Änderungen von V , die durch Änderungen der Bikarbonatkonzentration hervorgerufen werden, sind in Natrium-freiem Ringer reduziert und umgekehrt. Dies ist eine Folge der engen Kopplung der beiden Flüsse.

(c) Sowohl die Na^+ -induzierten als auch die HCO_3^- -induzierten Änderungen von V sind durch SITS oder DIDS hemmbar.

Alle diese Voraussagen wurden in dieser Arbeit überprüft und ihre Richtigkeit bestätigt. Zusätzliche Hinweise für die Richtigkeit dieses Modells liefern die Reaktionen auf Na oder

Li nach der Zugabe von Bikarbonat zu bikarbonat-verarmten Zellen. Nach Zugabe von Bikarbonat kommt es zu einer bis zu einigen Minuten anhaltenden Hyperpolarisation, die laut Modell durch einen elektrogenen (an Na oder Li gekoppelten) Einstrom von Bikarbonat in die Zelle verursacht wird. Wird in dieser Phase nun Natrium (oder Lithium) entzogen, so wird der Einstrom blockiert und damit die Hyperpolarisation inhibiert. Während dieser Phase sollte also entsprechend dem Modell die Reaktionen von V auf Natriumentzug verstärkt sein. Dies wurde in der Tat sowohl für Natrium als auch für Lithium (letzteres ist in Bild 22 gezeigt) gefunden.

Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht auch durch andere Prozesse, die bekanntermassen an Säugetierzellen vorkommen, beschrieben werden können.

Bei einer großen Anzahl verschiedener Säugetierzellen ist die Existenz eines elektroneutralen, Amilorid-hemmbar Na-Protonen-Gegenaustauschs bekannt. Einen derartigen Prozess nehmen wir auch für unser System an. Weiterhin kennt man von Säugetierzellen elektroneutrale Anionenaustauscher, die durch Stilbene hemmbar sind und u.a. einen Bikarbonat-Chlorid-Gegenaustausch vermitteln. Diese beiden Prozesse allein können die Ergebnisse sicher nicht erklären, da beide elektroneutral sind. Wir können nun weiterhin die Existenz einer Bikarbonat- (oder

OH^- , H^+) Leitfähigkeit postulieren, die die in dieser Arbeit beschriebene Bikarbonat- und pH-Abhängigkeit von V gut erklären könnte. Diese Leitfähigkeit müsste aber zusätzlich Stilben-inhibierbar sein. Die Blockierung des angenommenen parallelen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers durch Stilbene würde eher eine Vergrößerung als eine Verringerung der pH- und Bikarbonatantwort von V hervorrufen, da so ein elektroneutraler Weg zum Ausgleich der transmembranalen Gradienten wegfiele und somit mehr über den elektrogenen Kanal fließen sollte.

Auch Inhibition des Na^+/H^+ -Antiports (durch Amilorid oder Na-freie Lösung) sollte tendentiell zu einer Verstärkung, keineswegs jedoch zu einer Verringerung der Bikarbonatantwort führen. Experimentell wurde jedoch eine starke Verminderung der Antwort in Na-freiem Ringer gefunden. Auch die Reaktion von V auf Na lässt sich durch dieses Modell nicht erklären. Eine Natriumleitfähigkeit sollte Spannungsänderungen hervorrufen, die den beobachteten genau entgegengesetzt sind. Auch die Kombination des Na^+/H^+ -Antiports parallel zu einer pH- (HCO_3^-) Leitfähigkeit ist zur Erklärung der Daten völlig ungeeignet: Na-Entzug sollte dann zu einer intrazellulären Ansäuerung führen (durch Einstrom von

Protonen gekoppelt an den Ausstrom von Na), der über die pH- (HCO_3^-) Leitfähigkeit die Zelle hyperpolarisieren sollte, was dem Experiment widerspricht. Auch sollte die Reaktion dann Amilorid-hemmbar sein, was nicht beobachtet wurde. Der Einfluß von Bikarbonat auf die Na-Reaktion passt genausowenig in dieses Modell. Bikarbonat-freie Lösung sollte

Protonen gekoppelt an den Ausstrom von Na), der über die pH- (HCO_3^-) Leitfähigkeit die Zelle hyperpolarisieren sollte, was dem Experiment widerspricht. Auch sollte die Reaktion dann Amilorid-hemmbar sein, was nicht beobachtet wurde. Der Einfluß von Bikarbonat auf die Na-Reaktion passt genausowenig in dieses Modell. Bikarbonat-freie Lösung sollte

Protonen gekoppelt an den Ausstrom von Na), der über die pH- (HCO_3^-) Leitfähigkeit die Zelle hyperpolarisieren sollte, was dem Experiment widerspricht. Auch sollte die Reaktion dann Amilorid-hemmbar sein, was nicht beobachtet wurde. Der Einfluß von Bikarbonat auf die Na-Reaktion passt genausowenig in dieses Modell. Bikarbonat-freie Lösung sollte

die pH-Regulation über den elektroneutralen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austausch blockieren und Na-Entzug dann über den Na^+/H^+ -Antiport zu grösseren pH_i -Änderungen führen, was über die hypothetische pH-Leitfähigkeit zu verstärkten Reaktionen (aber umgekehrten Vorzeichens!!) führen sollte (eine HCO_3^- -Leitfähigkeit sollte allerdings blockiert werden). Auch ein Einfluß von SITS oder DIDS auf die Na-Reaktion würde in diesem Modell eher eine Verstärkung der Reaktion (wiederum mit falschem Vorzeichen!) verursachen. Wie man sieht, führt dieses Modell auf eine Anzahl von Widersprüchen zum Experiment.

4.5.1 Kationenabhängigkeit der Bikarbonatreaktion

Die Reaktion von V auf einen konstant bleibenden Wechsel in der Bikarbonatkonzentration wurde in der Anwesenheit verschiedener Kationen in der Badlösung untersucht. Es ergab sich, daß in Anwesenheit von Lithium die Reaktion am wenigsten verändert wurde, während die organischen Kationen Cholin, Tetramethylammonium und Bis(2-hydroxyethyl)dimethylammonium und auch Kalium die Amplitude stark verringerten. Die Verringerung unter Ersatz von Natrium durch Kalium war sogar stärker als die unter Cholin. Obwohl dieser Unterschied für das gesamte Kollektiv nicht signifikant war, wurde er an jeder einzelnen Zelle, an der der Effekt beider Kationen getestet wurde, beobachtet. Dies könnte bedeuten, daß neben der Größe der Kationen auch andere Einflüsse, wie z.B. die Membranspannung V, die unter Kalium stark reduziert wurde, einen Einfluss auf den Prozess besitzen.

Unter Lithium verringerte sich die Totalamplitude der Reaktion (Bild 16 (A)), während sich der Mittelwert aus dem direkten Auf- und Abstrich der Spannung nach Wechsel der Bikarbonatkonzentration nicht signifikant von dem Wert in der Gegenwart von Natrium unterschied (Bild 16 (B)). Dies erfordert eine genauere Analyse des Spannungsverlaufs nach Änderung der Bikarbonatkonzentration.

Nimmt man in erster Näherung an, daß sich die gemessenen Spannungsänderungen nur durch den elektrogenen Transport über das postulierte Natrium-Bikarbonat-Cotransportsystem ergeben, so ist die Auslenkung der Membranspannung aus dem steady-state

ein (durch parallele Leitfähigkeiten wie z.B. für Kalium beeinflusstes) Maß für die über den Transporter gekoppelten Gradienten von HCO_3^- und Na^+ . Der direkte Aufstrich oder Abstrich nach Änderung von $[\text{HCO}_3^-]_o$ ist folglich Ausdruck des idealerweise sofortig erzeugten HCO_3^- -Gradienten über der Membran und des relativen Anteils dieses Transporters an der Gesamtleitfähigkeit. Der Abfall des Signals ist eine Folge des Abbaus des Bikarbonatgradienten, überlagert mit dem Effekt des durch den Transporter vermittelten Aufbaus eines Natriumgradienten. Dieser Abfall ist demnach nicht nur Ausdruck des Transporters selbst, sondern auch aller anderen - auch elektroneutralen - Prozesse, die an transmembranalen Bewegungen von HCO_3^- und Na^+ beteiligt sind. Eine Veränderung dieses Abfalls macht sich auch bei konstanter Amplitude der direkten Reaktion in einer Veränderung der Gesamtamplitude bemerkbar. Daher ist die direkte Änderung von V nach Änderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen ein relativ direktes Maß für die Eigenschaften des angenommenen Transporters, während die Totalamplitude (oder die Schnelligkeit der Rückkehr von V zum steady-state, ΔV_{rlo} und ΔV_{rhi} gemäß Bild 24) ein empfindlicher Messwert für Änderungen von transmembranalen Na- und Bikarbonatfluxen jedweder Art ist.

Diese Überlegungen legen nun nahe, daß Ersatz von Natrium durch Lithium den Transporter selbst in Vergleich zu anderen, HCO_3^- und Na^+ Bewegungen vermittelnden Prozessen nur wenig beeinflusst. Ein derartiger anderer Prozess, der sowohl Na^+ - als auch (indirekt) HCO_3^- -Fluxe vermittelt, ist, wie später auch bei dem Effekt von Amilorid diskutiert, der Na^+/H^+ -Gegenaustausch. Allerdings ist von diesem Antiport bekannt, daß er anstelle von Na^+ auch Li^+ transportiert (75, 72, 79, 34). Dies wurde sogar für kultivierte bovine Corneaendothelzellen gezeigt (75), wobei jedoch die Transportraten in Vergleich zu denen in Anwesenheit von Natrium nicht bekannt sind.

Während in Na-Ringer die Antwort auf Bikarbonat asymmetrisch war (die Hyperpolarisation bei Zugabe von Bikarbonat war grösser als die Depolarisation bei Verringerung von $[\text{HCO}_3^-]_o$, vgl. Bild 25), war der Spannungsverlauf in Li-Ringer

nahezu symmetrisch. Es kann vermutet werden, daß die asymmetrische Form in Na-Ringer durch die Kopplung des Bikarbonats an Na verursacht ist. Da durch die Na^+/K^+ -ATPase ein nach intrazellulär abfallender Na-Gradient aufrechterhalten wird, sollte in der Tat der Einfluß von Bikarbonat in die Zelle im Vergleich zum Ausstrom (bei Bikarbonatgradienten gleicher Grösse, aber umgekehrten Vorzeichens) verstärkt sein. Von der Na^+/K^+ -ATPase ist bekannt, daß sie durch Lithium nur gering aktiviert wird und Li an Stelle von Na in sehr geringem Maße transportiert wird (siehe 19, 76, 36). Daher kann man annehmen, daß nach einiger Zeit $[\text{Li}^+]_i$ grösser als $[\text{Na}^+]_i$ ist und dadurch die Kopplung an Li keine Asymmetrie des Signals hervorruft. Weiterhin erschwert die wahrscheinlich in Vergleich zu Na höhere intrazelluläre Li-Konzentration einen direkten Vergleich zu den Daten in Na-Ringer, da die intrazelluläre Kationenkonzentration einen Einfluß auf den Transporter besitzen kann. Nach Inkubation mit Ouabain, das über Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase die intrazelluläre Na-Konzentration erhöht (auch hier wurde ein symmetrisch werdender Spannungsverlauf beobachtet), wurde eine geringfügige Steigerung der Amplitude der bikarbonatinduzierten Spannungsantwort gesehen, was möglicherweise über eine Aktivierung des Transporters durch $[\text{Na}^+]_i$ erklärbar wäre. Somit könnte auch $[\text{Li}^+]_i$ einen ähnlichen Einfluß besitzen. In diesem Fall wäre es denkbar, daß der Transporter unter vergleichbaren Bedingungen in Li-Ringer weniger aktiv als in Na-Ringer ist, daß aber durch den Einfluß von $[\text{Li}^+]_i$ ähnliche Amplituden der Spannungsantwort erhalten werden.

4.5.2 Möglicher Lithium-Bikarbonat-Cotransport

In der vorangegangenen Diskussion wurde bereits implizit angenommen, daß auch Li über den gleichen Prozess mit HCO_3^- cotransportiert wird. Dafür spricht die ähnliche Reaktion von V auf Ersatz von Li durch Cholin wie bei Ersatz von Na durch Cholin. Überdies konnte in beiden Fällen die Reaktion durch nominell bikarbonatfreies Medium als auch durch SITS (oder

DIDS) gehemmt werden.

Während bei Bikarbonatkonzentrationsänderungen in Li-Ringer kein direkter Hinweis auf eine kleinere Transportrate in Gegenwart von Li gefunden werden konnte, scheint dies bei diesen Experimenten der Fall zu sein, weil:

(i) die Spannungsänderungen bei Na-Ersatz durch Cholin grösser waren als bei Li-Ersatz durch Cholin, und

(ii) der Ersatz von Na durch Li (und Cholin) zu einer Depolarisation führte, was direkt zeigt, daß der Efflux von Natrium über den Transporter größer als der Influx von Lithium ist^(*).

Es ist interessant, diese Ergebnisse mit anderen Transportprozessen, an denen Na beteiligt ist, zu vergleichen. Während, wie bereits oben erwähnt, in der Na^+/K^+ -ATPase Li kaum Na ersetzen kann (19), wird Li gut anstelle von Natrium durch den Na^+/H^+ -Antiport einer Vielzahl verschiedener Zelltypen transportiert (75, 72, 79, 34). Auch bei einem elektroneutralen Prozess an dem Entenmuschel-Muskel, der wahrscheinlich einen Austausch von $\text{Na}^+/\text{H}^+//\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ vermittelt und der ähnlich wie der hier beschriebene Transporter durch Stilbene hemmbar ist, kann Li teilweise Na ersetzen (11). In diesem Fall war die gemessene Alkalisierungsrates des Zytoplasmas etwa um einen Faktor 3 heruntergesetzt. Interessanterweise kann auch der elektroneutrale, stilben-inhibierbare Anionenaustauscher von Erythrocyten einen Flux von Na und Li vermitteln (19, 27, 18, 4, 16). In jenem Fall wurde die Hypothese eines Transports des Ionenpaares NaCO_3^- bzw. LiCO_3^- aufgestellt.

4.5.3 Stöchiometrie des Cotransportes

Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine eindeutige Schlussfolgerung über die Stöchiometrie des angenommenen Cotransportes möglich. Wir können lediglich (bei Ausschluß der Beteiligung anderer Ionen) ein 1:1 Verhältnis des Transportes ausschliessen, da

(*) Der Ersatz von 46 mM Na durch Cholin (Wechsel von Lösung 1 zu Lösung 8) kann nicht die alleinige Ursache für die Depolarisation sein, da Ersatz von 81 mM Na durch Cholin (Wechsel von Lösung 1 zu Lösung 13) zu einer geringeren Depolarisation führte.

dies zu einem elektroneutralen Prozess führt. Eine Kopplung des Flusses zweier Bikarbonationen an ein Natriumion kann die beschriebenen elektrischen Phänomene gut erklären. Nimmt man an, daß die durch den Transport verursachten Spannungsänderung V sich durch die einfache Beziehung

$$(1) \quad V = g \cdot \ln([HCO_3^-]_O^2 \cdot [Na^+]_O / ([HCO_3^-]_i^2 \cdot [Na^+]_i))$$

beschrieben liesse (wobei g eine Konstante ist, die neben dem Faktor $RT/nF^{(*)}$ die relativen Anteil des Transports am Gesamttransport beschreibt), so sollte das Verhältnis

$$(2) \quad Q = (\partial V / \partial \ln[HCO_3^-]_O) / (\partial V / \partial \ln[Na^+]_O)$$

an einem Punkt gleicher Ionenkonzentrationen gleich zwei sein. Experimentell wurde - unter Berücksichtigung der Diffusionspotentiale - ein Wert von 2.55 ± 0.64 erhalten. Dies würde im Rahmen des Modells auf eine Kopplung von 2 bis 3 Bikarbonationen an den Fluß eines Natriumions schließen lassen. Es erscheint jedoch verfrüht, allein aus diesen elektrischen Daten definitive Rückschlüsse auf die Stöchiometrie eines Ionentransportes zu ziehen.

4.6 Einfluß von Amilorid

Amilorid, ein Inhibitor passiver Natriumbewegung in vielen Systemen (Übersicht: 5), hatte in einer Konzentration von 10^{-3} M keinen Einfluß auf die Größe der Depolarisation, wenn diese durch kurze (10 s) Pulse geringerer Natrium- oder Bikarbonatkonzentration hervorgerufen wurde. Es beeinflusste jedoch die Totalamplitude ΔV_{tot} der bikarbonat-induzierten Spannungsänderungen, wenn die Lösungswechsel in grösseren Abständen vorgenommen wurden. Auch in letzterem Fall waren jedoch die direkten Auf- und Abstriche (ΔV_{up} bzw. ΔV_{do}) nach Lösungswechsel praktisch unbeeinflusst (Bild 24, 25).

Wie in der Diskussion der Kationenabhängigkeit bereits angeführt, ist die unmittelbare Spannungsänderung nach Lösungswechsel ein direkterer Ausdruck des elektrogenen Cotransportes als die Totalamplitude, in der andere Prozesse, die transmem-

(*) R := allgemeine Gaskonstante, T := absolute Temperatur, n := Anzahl der Elementarladungen, F :=Faradaykonstante

branale Fluxe von Na oder HCO_3^- vermitteln, eingehen. Im Falle der Amiloridexperimente wurde daher die Signalform näher analysiert. Es ergab sich hier, daß die Totalamplitude ΔV_{tot} über eine Veränderung der Rückkehrgeschwindigkeit des Potentials zu steady-state Werten (ΔV_{rhi} und ΔV_{rlo}) verändert wurde.

Ein Prozess, der Amilorid-empfindlich ist und eine Dissipation sowohl von Bikarbonat- als auch von Natriumgradienten bewirken kann, ist der Na^+/H^+ -Antiport. Eine Blockade dieses Antiports, die an anderen Zelltypen durch Amilorid in hohen Konzentrationen (1 mM) bewirkt werden kann (5), sollte in der Tat zu einer Verlangsamung des Abfalls des Signals nach einer Auslenkung durch einen durch Lösungswechsel hervorgerufenen Bikarbonatgradienten führen.

Hinweise für die Existenz eines derartigen Antiports in Corneaendothelzellen ist einerseits die Reduzierung des transendothelialen Flüssigkeitstransportes und der transendothelialen Spannung durch Amilorid (1mM) (56) und - direkter - der Nachweis eines Amilorid-empfindlichen Protoneneinstrom in mit Lithium präinkubierten bovinen Corneaendothelzellen (75).

Inhibition einer Natrium-Leitfähigkeit - dies ist ein anderer Effekt von Amilorid, der meist schon bei geringeren Konzentrationen (10^{-5}M) beobachtet wird (5) - sollte dagegen eher zu einer schnelleren Rückkehr zum Ausgangswert führen. Der an den Bikarbonatflux gekoppelte Einstrom von Natrium sollte eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration bewirken und daher bei Existenz einer merklichen Na-Leitfähigkeit zu einem verstärkten elektrogenen Efflux von Na^+ (bzw. einem verringerten Influx) führen. Dies sollte zu einer hyperpolarisierenden Komponente zusätzlich zum direkten elektrogenen Effekt des Cotransportes führen, die durch Amilorid blockiert würde. Ausserdem sollte Amilorid eine Vergrößerung der negativen Rückkopplung auf den Transport durch während des Transports erfolgende Erhöhung von $[\text{Na}^+]_i$ verursachen. Quantitative Angaben über diese Effekte liessen sich erst durch Aufstellen von Modellen und Lösen der entsprechenden Differentialgleichungen machen.

Neuerdings wurde auch ein anderer Effekt hoher Dosen von

Amilorid - nämlich der direkte Abbau transmembranaler pH-Gradienten aufgrund seiner Eigenschaft als permeable schwache Base - beschrieben (17). Dies wurde allerdings von einer anderen Gruppe bezweifelt (83). Ein derartiger Effekt könnte die hier erhobenen Daten nicht erklären. Ein Abbau des transmembranalen HCO_3^- -Gradienten, der einem Abbau des pH-Gradienten durch Amilorid parallel gehen sollte, würde zu einem schnelleren Abfall des elektrischen Signals auf HCO_3^- unter Amilorid führen. Experimentell wurde jedoch das Gegenteil beobachtet.

Amilorid verursachte andererseits auch eine Hyperpolarisation der Zellmembran. In einigen Fällen wurde auch bei Natrium-Entzug entweder in bikarbonat-freier Lösung oder nach Applikation von SITS oder DIDS eine Hyperpolarisation beobachtet. In den beiden letzteren Fällen ist der elektrogene Effekt des Na-HCO_3 -Cotransportes gehemmt, so daß die elektrischen Antworten anderer Na-abhängiger System leichter beobachtbar sein sollten. Diese Hyperpolarisation liesse sich am leichtesten durch eine Natriumleitfähigkeit erklären. Dagegen spricht allerdings die hohe Konzentration von Amilorid, die zu Erzielung der Hyperpolarisation notwendig war, als auch der fehlende Einfluß von Amilorid auf die durch Erniedrigung der Na-Konzentration verursachte Depolarisation. Da die elektrischen Effekte des Na-HCO_3 -Cotransportes und der hypothetischen Na-Leitfähigkeit umgekehrtes Vorzeichen besitzen, sollte die Depolarisation unter Erniedrigung von $[\text{Na}^+]_o$ durch Amilorid verstärkt werden, was jedoch nicht beobachtet wurde (Bild 25).

Andererseits lässt sich die Hyperpolarisation unter Amilorid weniger leicht durch einen Natrium-Protonen-Gegenaustausch erklären. In diesem Fall sollte sowohl Amilorid als auch Natriumentzug zu einer intrazellulären Ansäuerung führen. Dies führt, wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, zu einer (jedoch vorübergehenden) Hyperpolarisation der Zelle. Eine Verringerung der Kaliumleitfähigkeit durch zytoplasmatische Ansäuerung, wie sie in vielen System gefunden wurde (80) und was auch für unser System diskutiert wurde (Abschnitt 3.3), sollte genau den gegenteiligen Effekt haben.

Um zusammenzufassen, wird das Cotransportsystem auch durch ho-

he Dosen (10^{-3} M) von Amilorid wahrscheinlich nicht beeinflusst. Die Veränderung der Gesamtreaktion auf Bikarbonat unter Amilorid ist am wahrscheinlichsten auf die Inhibition eines Na^+/H^+ -Antiports zurückzuführen. Möglicherweise existiert auch eine Na-Leitfähigkeit in der Zellmembran, die jedoch nur geringen Ausmaßes sein kann.

4.7 Einfluß von Ouabain

Ouabain, ein spezifischer Inhibitor der Na^+/K^+ -ATPase, verursacht in einer Konzentration von 10^{-4} M innerhalb von Sekunden einen Abfall der Membranspannung um ungefähr 7 mV. Dieser Effekt wurde beinahe unverändert auch bei einer Konzentration von 10^{-5} M beobachtet. Da innerhalb dieses Zeitraums eine merkliche Veränderung des transmembranalen Kaliumgradienten praktisch ausgeschlossen ist, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um den direkten elektrogenen Anteil der Na-K-Pumpe an der Membranspannung. Auch an anderen epithelialen Zellen, wie zum Beispiel im proximalen Tubulus der Rattenniere (23), hat die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain einen vergleichbaren Einfluß auf V.

Der später folgende langsame Abfall der Membranspannung ist wahrscheinlich auf einen Abbau des Kaliumgradienten zurückzuführen, der nicht mehr durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird.

In zwei Arbeiten wurde bisher die Wirkung von Ouabain auf die Membranspannung von Kaninchencorneaendothelzellen beschrieben (59, 48). Allerdings wurde der Verlauf des Effektes nicht an einzelnen Zellen beobachtet, sondern Mittelwerte von V nach längerer Inkubationszeit mit Ouabain angegeben. Dies erlaubt keine Rückschlüsse auf den direkt elektrogenen Anteil der Pumpe, da in der Zwischenzeit sich die transmembranalen Ionengradienten merklich geändert haben sollten. (Jumblatt (48) beschrieb an kultivierten Kaninchencorneaendothelzellen eine Depolarisation um ca. 10 mV während der ersten 10 min, während kein weiterer Abfall während der folgenden 2 Stunden beobachtet wurde. Letzteres steht im Gegensatz zu dieser Arbeit).

Ouabain (10^{-4} M) hemmt nicht den Natrium-Bikarbonat-Co-

transporter. Dies geht aus der eher leicht vergrößerten Amplitude der bikarbonat-induzierten Änderungen von V hervor, die einige Minuten nach Gabe von Ouabain beobachtet wurde. Wie schon für den Li-HCO_3^- -Cotransport diskutiert, könnte man dies eventuell auf die durch Hemmung der aktiven Natriumpumpe erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration zurückführen, die einen aktivierenden Einfluß auf den Transporter haben könnte. In dieses Bild passt auch die unter Ouabain symmetrischer werdende Bikarbonatantwort, da bei Angleichung von $[\text{Na}^+]_i$ an $[\text{Na}^+]_o$ die Kopplung des Bikarbonatfluxes an Natrium nicht mehr den Influx von Bikarbonat selektiv erleichtern sollte.

4.8 Modell für den transendothelialen Transport in der Cornea

Bevor hier ein Modell für den Ionentransport über das Endothel der Cornea vorgestellt wird, muß noch einmal betont werden, daß die hier angewandte Punktionsmethode leider keine Hinweise auf die Lokalisation der Membranprozesse in der apikalen oder basolateralen Membran liefert. Die Gründe dafür wurden schon in Abschnitt 4.3 diskutiert. Die Vorschläge für die Lokalisation dieser Prozesse basieren daher auf der Kenntnis der Transportrichtung der Ionen, die aus transepithelialen Messungen gewonnen wurden. Außerdem ist das Modell analog zu Schemata, die für andere Natrium und Bikarbonat transportierende Epithelien aufgestellt wurden (9).

Das von dem Autor vorgeschlagene Modell ist in Bild 27 dargestellt. Es wird angenommen, daß das Na-HCO_3^- -Cotransportsystem an der apikalen Seite der Zelle lokalisiert ist. Dieser Prozess ist durch die Stilbenderivate SITS und DIDS inhibierbar.

Es wird angenommen, daß sich ein Na^+/H^+ -Antiport an der basolateralen Zellmembran befindet. Dieser Transporter ist durch Amilorid hemmbar. Die Daten, die für die Existenz dieses Prozesses in Corneaendothelzellen sprechen, wurden bereits bei der Diskussion über den Einfluß von Amilorid angeführt. Der Transport von Bikarbonat durch den Antiport erfordert die intrazelluläre Umwandlung von CO_2 , das leicht über die Lipidbarriere der Plasmamembran diffundiert (35), in Kohlensäure,

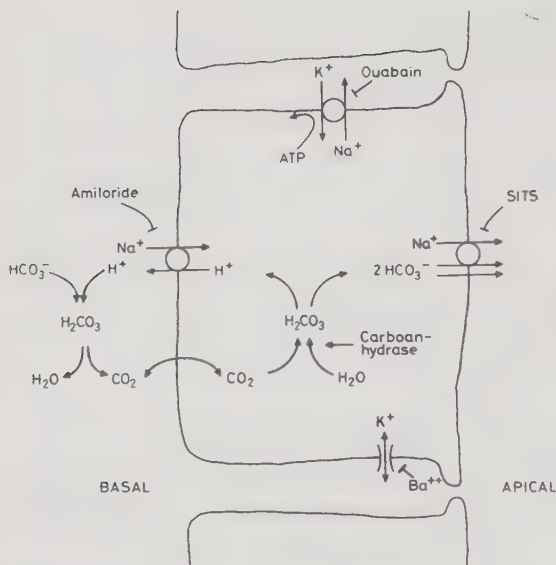


Bild 27: Modell für den Transport von Bikarbonat und Natrium über das Endothel der Cornea.

die dann wiederum in Protonen und Bikarbonat dissoziiert. Die Reaktion von CO_2 und Wasser zu Kohlensäure wird intrazellulär durch die Carboanhydrase katalysiert. Die Existenz dieses Enzyms in Endothelzellen der Cornea wurde mehrfach durch histochemische Methoden nachgewiesen. Während Hodson und Miller es vorwiegend an der apikalen Membran lokalisiert haben wollen (38), beschreiben es andere Arbeiten (63, 65) als diffus im Zytoplasma verteilt mit einer eher etwas größeren Konzentration an der basalen Seite.

Eine Na^+/K^+ -ATPase, über deren Lokalisation keine Aussage gemacht werden kann (*), erzeugt die transmembranalen Na und K Gradienten. Hauptsächlich über den letzten Gradienten, der über eine mit Barium blockierbare Kaliumleitfähigkeit wohl für ca. 80% der Membranspannung verantwortlich ist, aber auch durch den direkt mit dem Transport verbundenen Ladungstransport, erzeugt die ATPase auch die Spannung über die Plasmamembran. Möglicherweise existiert auch eine geringfügige Na-

(*) Kaye et al. (49, 50) wollen diesen Prozess mit histochemischen Methoden in der lateralen Membran von Kaninchencorneaendothelzellen lokalisiert haben.

triumleitfähigkeit, die die Hyperpolarisation durch Amilorid erklären könnte.

In diesem Modell sind die Ionengradienten, die die Na^+/K^+ -ATPase erzeugt, ausreichend, um die Energie für den Transport von Bikarbonat zu liefern. Somit könnte ein sekundär aktiver Transport vorliegen. Bei alleiniger Existenz der postulierten Transportsysteme und einer fehlenden Konzentrationsdifferenz der Ionen über dem Endothel sollte immer dann ein Transport von HCO_3^- in die Augenkammer stattfinden, wenn

$$(3) \quad [\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i > \exp\left(\frac{eV}{kT}\right)$$

ist. Dabei ist e die Elementarladung, V die transmembranale Spannung, k die Boltzmannkonstante und T die Temperatur.

(Diese Beziehung ergibt sich aus folgender Überlegung: Existierte allein der Natrium-Protonen-Antiport, so wäre

$$(4) \quad [\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i = [\text{H}^+]_o / [\text{H}^+]_i.$$

Bei Annahme eines Gleichgewichts von Kohlendioxid über der Membran ergibt sich daraus

$$(5) \quad [\text{HCO}_3^-]_i = [\text{HCO}_3^-]_o ([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i).$$

Bei alleiniger Existenz eines elektrogenen Natrium-2Bikarbonat-Cotransports würde sich ergeben:

$$(6) \quad [\text{HCO}_3^-]_i = ([\text{HCO}_3^-]_o^2 ([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i) \exp(eV/kT))^{1/2}.$$

Ein Transport in die apikale Richtung findet statt, solange die über den Natrium-Protonen-Antiport erzeugte intrazelluläre Bikarbonatkonzentration grösser als die durch den elektrogenen Natrium-Bikarbonat-Cotransport geschaffene ist. Daraus ergibt sich die Ungleichung.)

Die obige Bedingung sollte immer erfüllt sein, da sowohl V negativ als auch $[\text{Na}^+]_o > [\text{Na}^+]_i$ ist. Die sich so ergebende Transportrichtung liefert gleichzeitig die Begründung für die Annahme des Na^+/H^+ -Antiports in der basolateralen, und des $\text{Na}^+-2\text{HCO}_3^-$ -Cotransports in der apikalen Membran.

Dieses Modell ist auch in der Lage, die meisten transendothelialen Befunde zu erklären. Wie eben diskutiert, sagt es einen Natrium- und Bikarbonattransport in die vordere Augenkammer voraus, wie dies vielfach experimentell bestätigt wurde. Die beobachtete Kopplung des Natrium-Transportes an Bikarbonat (42) und umgekehrt (31) kann sowohl durch den

$\text{Na}^+-2\text{HCO}_3^-$ -Cotransport als auch durch den Na^+/H^+ -Antiport erklärt werden. Die Hemmung des Transports durch Ouabain (62, 20, 38) ist in dem Modell auf die Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase zurückzuführen, die sekundär zu einer Dissipation der Ionengradienten und der Membranspannung führen, die beide zusammen die Energie für den Transport liefern. Die Hemmung des Transports durch Amilorid (1mM) (56) ist durch Hemmung des Na^+/H^+ -Antiports, und die durch SITS (1mM) (56) durch Hemmung des Bikarbonat-Natrium-Cotransportes zu erklären. Auch die Hemmung der Carboanhydrase führte zu verringerten Transportraten (38, 43, 20).

Die direkte Ursache für die kleine transendotheliale Spannung von 1 mV, Kammerwasserseite negativ, ist bisher unbekannt. Als Entstehungsmechanismus wurden sowohl ein direkt elektrogener Anionentransport, als auch Diffusionsspannungen über die undichten Interzellularspalten diskutiert (20, 37, 57). Letzteres erscheint aber als unwahrscheinlich, da die dazu erforderlichen transendothelialen Konzentrationsdifferenzen der Ionen *in vivo* wohl nicht erreicht werden (61). Die Ladungsverschiebung des in dieser Arbeit erstmals an diesen Zellen beschriebenen Natrium-Bikarbonat-Cotransportes hat bei Lokalisation in der apikalen Membran das richtige Vorzeichen, um die transendotheliale Spannung zu erklären. Es wäre jedoch verfrüht, die Spannung allein auf diesen Transporter zurückzuführen, da andere Ionenströme, deren Grössen nicht genau bekannt sind, mit zu der Entstehung beitragen.

4.9 Vergleich mit anderen HCO_3^- - oder H^+ - transportierenden Systemen

In dieser Arbeit wurde die Existenz eines fest gekoppelten, elektrogenen, Stilben-inhibierbaren Cotransportes in Corneaendothelzellen vom Rind vorgeschlagen. Eine Kopplung von Bikarbonat- mit Natriumfluxen ist in einer grösseren Anzahl anderer Gewebe beschrieben worden (eine Übersicht wird in (80) gegeben). Diese Transportsysteme spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären pH, oder in anderen Zellen für den Transport von Chlorid oder Bikarbonat.

Ein fest gekoppelter Transport von Na^+ , HCO_3^- , Cl^- (und wahrscheinlich H^+) wurde in mehreren Invertebratenzellen, dem Tintenfischaxon (squid axon) (10, 12), dem Schneckenneuron (snail neurone) (87, 89) und dem Entenmuschelmuskel (barnacle muscle) (11, 82, 13), gefunden. Ein ähnlicher Transportprozess wurde auch am Flußkreb (crayfish, *P. olarkii*) gefunden (71). Diese Transportprozesse sind elektroneutral und durch SITS inhibierbar. Sie vermitteln einen Cotransport von Natrium und Bikarbonat im Austausch gegen Chlorid und möglicherweise Protonen. Trotz dieser gemeinsamen Eigenschaften unterscheiden sie sich in einigen Punkten. Während in dem Tintenfischaxon intrazelluläres ATP für den Transport von sauren Valenzen aus der Zelle heraus erforderlich ist (12), wird der entsprechende Prozess des Schneckenneurons nicht durch metabolische Inhibitoren beeinflusst (87). In der Entenmuschel wurde die Abhängigkeit des Transportes von metabolischer Energie noch nicht untersucht. In Säugetierzellen wurde bisher jedoch kein derartiger Transporter, der einen Natriumfluss fest an einen Bikarbonatfluss koppelt, beschrieben. In Purkinje-Fasern des Schafherzens wurde ein Stilben-inhibierbarer $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch beschrieben (94), der jedoch von Natrium unabhängig ist (95). Im Soleus Muskel der Maus wurde das parallele Vorhandensein eines Na^+/H^+ -Antiports mit einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher vorgeschlagen (1, 2). Der letzte Prozess war durch Stilbenderivate inhibierbar. In diesen beiden Säugetiersystemen sind die Austauschprozesse offensichtlich elektroneutral.

Drei neuere Arbeiten (8, 9, 33) beschreiben Mechanismen des Bikarbonattransportes in Zellen des proximalen Tubulus von Amphibiennieren. In der basolateralen Membran der Salamanderniere (*Ambystoma*) befindet sich ein Transportsystem (9), dessen elektrische Eigenschaften den in dieser Arbeit beschriebenen weitgehend ähneln. Jener Transportprozess koppelt wahrscheinlich den Fluß von zwei Bikarbonationen an den eines Natriumions und verschiebt somit negative Ladung in die Transportrichtung beider Ionen. Dieser Transporter ist durch Stilbenderivate blockierbar und ist wahrscheinlich chloridunabhängig. Im proximalen Tubulus von *Nocturus* wurde eine enge Kopplung von Natrium-, Bikarbonat- und Chloridfluxen beschrieben

(33). Auch dieser Transport konnte durch SITS inhibiert werden. Wie in der Salamanderniere wurde ein Transport von negativer Ladung mit den Natrium- und Bikarbonationen, diesmal aber auch entgegen den Chloridionen beobachtet. Da dieses Transportsystem von Chlorid abhängt, kann es nicht mit dem beim Salamander beschriebenen Prozess identisch sein. Es wurde daher die parallele Anordnung eines $\text{Na}^+ - 2\text{HCO}_3^-$ -Cotransportes mit einem elektroneutralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers vorgeschlagen (33).

In proximalen Tubuluszellen von Säugetieren wurde bisher keine Kopplung des basolateralen Transportes von Bikarbonat an Natrium beschrieben. Bei der Ratte existiert eine basolaterale Bikarbonatleitfähigkeit, die durch Acetazolamid und SITS hemmbar ist (25, 91, 26).

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit des Transportes von metabolischer Energie nicht untersucht. Wie oben diskutiert, sollte die Energie des transmembranalen Gradienten von Natrium und die Membranspannung für den Transport jedoch ausreichend sein. Ausserdem scheint der Transportprozess in beide Richtungen ablaufen zu können, da sowohl eine Depolarisation bei Bikarbonat- (bzw. Natrium-) Entzug und eine Hyperpolarisation bei Bikarbonat- (bzw. Natrium-) Zugabe beobachtet wurde. Dies demonstriert, daß der Transport nicht stark asymmetrisch in eine Richtung verläuft, wie man dies bei einem direkt durch Freisetzung von Stoffwechselenergie (z.B. durch Spaltung von ATP) getriebenen Prozess erwarten könnte. Auch beim Schnecken-neuron, dessen $\text{Na}^+/\text{H}^+//\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Transporter keine Stoffwechselenergie benötigt, wurde ein möglicher Verlauf des Transportes in beiden Richtungen beschrieben (90), ebenso wie beim Entenmuschelmuskel (82).

Die Beteiligung von Chlorid an dem Transportsystem wurde in vorliegender Arbeit nicht behandelt. Vorläufige Experimente haben jedoch ergeben, daß sowohl die Bikarbonat- als auch die Natriumreaktion in gewissen Masse chloridabhängig sind.

Interessant ist der Vergleich des Corneaendothels mit dem proximalen Tubulus der Niere. Beides sind undichte Epithelien, die Wasser gekoppelt an Natrium- und Bikarbonatfluxe transpor-

tieren. Während dieser Transport in der Niere von apikal nach basolateral verläuft, ist die Richtung bei dem Corneaendothel umgekehrt. In beiden Systemen scheinen zumindest Teile des Bikarbonat- und des Natriumeintrittes in die Zelle über einen Natrium-Protonen-Gegenaustausch zu erfolgen, während der Austritt von Bikarbonat an der Gegenseite elektrogen, SITS-inhibierbar und bei dem Corneaendothel und dem proximalen Tubulus des Salamander und von *Necturus* an Natrium gekoppelt ist. Während das elektroneutrale $\text{Na}^+/\text{H}^+//\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauschsystem des Tintenfischaxons, des Entenmuschelmuskels und des Schnecken-neurons vorwiegend der Regulierung des intrazellulären pH dient (und damit vorwiegend HCO_3^- in die Zelle hinein transportiert), schafft die Kopplung des Bikarbonatfluxes an negative Ladung energetisch günstige Voraussetzungen für einen Efflux aus der Zelle heraus. Dies entspricht genau der Funktion des transepithelialen Transportes, der sowohl bei der Cornea als auch bei den proximalen Tubuli, nicht jedoch bei den Nerven- und Muskelzellen vorliegt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Kopplung des elektrogenen Bikarbonateffluxes an Natrium. Während in den meisten nicht direkt durch metabolische Energie getriebenen Co- und Gegentransportsystemen, an denen Na^+ beteiligt ist, der Natriumgradient benutzt wird, um andere Substanzen gegen ihren Konzentrationsgradient zu transportieren (z.B. Protonen im Na^+/H^+ -Antiport, Ca^{++} im Natrium-Calcium Gegenaustausch oder Zucker und Aminosäuren in Na-abhängigen Transportsystemen) und somit unter physiologischen Bedingungen einen Natriumeinstrom in die Zelle vermitteln, wobei Na^+ durch die Na^+/K^+ -ATPase wieder aus der Zelle heraus transportiert werden muß, liegt hier wahrscheinlich ein Transporter vor, der Na^+ physiologischerweise aus der Zelle heraus transportiert. Dies stellt für Natrium- und Bikarbonat transportierende Epithelien eine ökonomische Lösung dar, da jetzt nicht mehr alle transzellulär transportierten Natriumionen unter direkter Aufwendung von Stoffwechselenergie (über die Na^+/K^+ -ATPase) aus der Zelle ausgeschleust werden müssen.

5. Zusammenfassung

Während *in situ* die Punktion von Endothelzellen der Cornea sehr schwierig ist, wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß mit kultivierten Corneaendothelzellen vom Rind intrazelluläre Ableitungen zu erhalten sind, die bis zu einigen Stunden stabil bleiben. Dies schuf die Voraussetzung für eine detaillierte Untersuchung der Reaktion der gemessenen Membranspannung auf die Ionenzusammensetzung der extrazellulären Lösung und auf Inhibitoren. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- (1) Die Membranspannung V kultivierter Corneaendothelzellen vom Rind lag hauptsächlich im Bereich von -40 bis -55 mV, mit einem Mittelwert von -46.3 ± 0.6 mV (SEM, $n=262$).
- (2) Änderungen der extrazellulären Bikarbonatkonzentration führten zu Änderungen von V . Eine Verringerung von $[\text{HCO}_3^-]_o$ führte zu einer vorübergehenden Depolarisation, eine Erhöhung zu einer vorübergehenden Hyperpolarisation. Das Ausmaß dieser Hyperpolarisation nahm mit der Präinkubationszeit in bikarbonatarmer Lösung zu. Nach Entzug von Bikarbonat wurde außerdem eine Gleichgewichtsdepolarisation von einigen mV beobachtet.
- (3) Diese Gleichgewichtsdepolarisation nach Bikarbonatentzug, aber nicht die durch HCO_3^- bewirkten vorübergehenden Spannungsänderungen, konnten durch den Kaliumkanalblocker Barium (1mM) reduziert werden. In der Abwesenheit von Bikarbonat/ CO_2 war die Reaktion der Plasmamembran auf Änderungen von $[\text{K}^+]_o$ verringert.
- (4) Änderungen des intrazellulären pH durch extrazelluläre Gabe von permeablen Puffern (Butyrat, Glycodiazin und Ammonium) führten ebenfalls zu vorübergehenden Änderungen von V . Prozeduren, die zu einer intrazellulären Alkalisierung führen sollten, waren von einer Depolarisation begleitet, solche, die eine intrazelluläre Azidifizierung bewirken, von einer Hyperpolarisation.

- (5) Änderungen des extrazellulären pH führten ebenfalls zu einer vorübergehenden Änderung von V. Hier bewirkte eine Alkalisierung eine Hyperpolarisation und eine Azidifizierung eine Depolarisation.
- (6) Methazolamid (10^{-4} M), ein Inhibitor der Karboanhydrase, bewirkte eine Verringerung der Spannungsantwort auf $[\text{HCO}_3^-]_o$ als auch auf Veränderungen des intrazellulären pH in nominell bikarbonatfreier Lösung.
- (7) SITS und DIDS (10^{-4} bis 10^{-3} M), die viele Anionentransportsysteme hemmen, bewirkten eine Reduktion der Reaktion von V auf Bikarbonat. Der Effekt dieser Stilbenderivate war zu dem von Methazolamid additiv.
- (8) Die vorübergehenden Spannungsantworten auf Änderungen von $[\text{HCO}_3^-]_o$ waren von der Natriumkonzentration des Mediums abhängig. Ersatz von Natrium durch große organische Kationen wie Cholin, Tetramethylammonium oder Bis(2-hydroxyethyl)dimethylammonium als auch durch Kalium führten zu einer starken Verringerung der Reaktion. Ersatz von Natrium durch Lithium hatte dagegen einen geringeren Effekt.
- (9) Veränderungen der extrazellulären Natriumkonzentration hatten ähnliche Auswirkungen wie Veränderungen von $[\text{HCO}_3^-]_o$. Verringerung von $[\text{Na}^+]_o$ führte zu einer vorübergehenden Depolarisation, Erhöhung zu einer vorübergehenden Hyperpolarisation. Das Ausmaß dieser Hyperpolarisation nahm mit der Zeitdauer der Präinkubation in natriumverarmter Lösung zu.
- (10) Diese Reaktion von V auf $[\text{Na}^+]_o$ war von der Bikarbonatkonzentration abhängig. In nominell bikarbonatfreier Lösung war die Depolarisation nach Natriumentzug geringer oder kehrte sich in einigen Fällen zu einer Hyperpolarisation um.
- (11) Die Anionentransportinhibitoren SITS oder DIDS (10^{-3} M) hatten einen ähnlichen Effekt auf die Natriumreaktion wie nominell bikarbonatfreie Lösung. Auch hier ergab sich eine Reduktion oder Umkehr der Spannungsantwort.

- (12) Die Spannungsantwort der Plasmamembran sowohl auf $[\text{HCO}_3^-]_o$ als auch auf $[\text{Na}^+]_o$ hing annähernd logarithmisch von der Ionenkonzentration beider Spezies ab. Bei $[\text{Na}^+]_o = 151 \text{ mM}$ und $[\text{HCO}_3^-]_o = 46 \text{ mM}$ betrugen diese Abhängigkeiten $39.0 \pm 9.0 \text{ mV/Dekade}$ für Bikarbonat und $15.3 \pm 5.8 \text{ (SD) mV/Dekade}$ für Natrium. Der Quotient beider Grössen beträgt $2.55 \pm 0.64 \text{ (SD)}$.
- (13) Nach einer Präinkubationsphase der Zellen mit Lithium führte Ersatz von Lithium durch Cholin zu ähnlichen Ergebnissen wie der Ersatz von Natrium durch Cholin. Auch hier wurde eine Depolarisation beobachtet, die durch nominell bikarbonatfreie Lösung als auch durch SITS reduziert oder umgekehrt werden konnte.
- (14) Amilorid (10^{-3} M) bewirkte eine reversible Hyperpolarisation der Gleichgewichtsspannung um $8.5 \pm 2.6 \text{ (SD) mV}$ ($n=13$). Bei einer Konzentration von 10^{-5} M war kaum ein Effekt zu erkennen (Hyperpolarisation um $0.8 \pm 0.9 \text{ mV}$, $n=8$).
- (15) Amilorid beeinflusste auch in einer Konzentration von 10^{-3} M weder die direkte Spannungsantwort auf $[\text{HCO}_3^-]_o$, noch die direkte Antwort auf $[\text{Na}^+]_o$. Es verlangsamte jedoch die Rückkehr des Membranpotentials zu seinem Gleichgewichtswert, nachdem es durch eine $[\text{HCO}_3^-]_o$ -Konzentrationsänderung ausgelenkt worden war.
- (16) Ouabain 10^{-4} M bewirkte innerhalb von Sekunden eine Depolarisation der Zellmembran um $6.8 \pm 1.1 \text{ (SD) mV}$ ($n=4$). Danach fiel V über einen längeren Zeitraum weiterhin ab. Der Effekt von Ouabain war bei einer Konzentration von 10^{-5} M nahezu identisch.
- (17) Ouabain 10^{-4} M hatte keinen direkten Einfluß auf die durch $[\text{HCO}_3^-]_o$ -Änderungen hervorgerufenen Spannungsänderungen.

Aufgrund dieser Daten wurde ein Modell für den transepithelialen Transport von Bikarbonat und Natrium über das Corneendothel des Rindes entwickelt.

Es wird die Existenz eines gekoppelten, elektrogenen Transportes von Natrium und Bikarbonat über die Plasmamembran vorgeschlagen, der in die Transportrichtung beider Ionen nettomässig negative Ladung verschiebt. Dieser Transport wird durch Stilbenderivate wie SITS oder DIDS inhibiert. An Stelle von Natrium kann wahrscheinlich auch Lithium durch den gleichen Prozess transportiert werden. Über die Stöchiometrie des Transportes kann keine endgültige Aussage gemacht werden, die elektrischen Daten sprechen jedoch für einen Cotransport von 2 - 3 Bikarbonationen mit einem Natriumion. Durch dieses Modell können die elektrischen Antworten der Plasmamembran auf Änderungen der Na^- , Li^- und HCO_3^- -Konzentration als auch möglicherweise die Effekte intra- sowie extrazellulärer pH-Änderungen auf V erklärt werden.

Neben diesem Transportprozess, der den Schwerpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit bildete, deuten die Daten indirekt auf die Existenz eines (elektroneutralen) Natrium/Protonen-Gegen austausches in der Plasmamembran, der durch hohe Dosen Amilorid hemmbar ist.

In dem vorgeschlagenen Transportmodell treten Natrium und Bikarbonat (letzteres durch Diffusion von CO_2 mit intrazellulärer Umwandlung in HCO_3^- durch die Karboanhydrase) über den Na^+/H^+ -Gegen austauscher an der basolateralen Seite in die Zelle elektroneutral ein und verlassen sie auf der Gegenseite (apikal) durch den gekoppelten elektrogenen Natrium-Bikarbonat-Cotransport. Die Energie für beide Transportprozesse könnte allein durch den transmembranalen Natrium-Gradienten, der durch die Ouabain-inhibierbare Na^+/K^+ -ATPase erzeugt wird, zur Verfügung gestellt werden.

Dieses Modell ist nicht nur in der Lage, die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu erklären, sondern ist auch in Übereinstimmung mit publizierten Daten über den transepithelialen Transport über Corneaendothelpräparate vom Kaninchen, Rind und Menschen.

Somit konnte in dieser Arbeit ein experimentell gut fundiertes Modell für den Transport von Natrium und Bikarbonat über das Corneaendothel des Rindes aufgestellt werden. Eine über dieses spezielle Gewebe hinausgehende Bedeutung hat der erstmalige Nachweis eines elektrogenen, Stilben-inhibierbaren Bikarbonat-Natrium-Cotransportes an Säugetierepithelzellen.

(Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht (45, 46, 47).)

6. Literaturverzeichnis

- (1) Aickin C.C., Thomas R.C. 1976. Micro-electrode measurement of the intracellular pH and buffering capacity of mouse soleus muscle. *J. Physiol. (London)* 267:791-810
- (2) Aickin C.C., Thomas R.C. 1977. An investigation of the ionic mechanisms of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J. Physiol. (London)* 273:295-316
- (3) Barry P.H., Diamond J.M. 1970. Junction Potentials, Electrode Standard Potentials and Other Problems in Interpreting Electrical Properties of Membranes. *J. Membrane Biol.* 3:93-122
- (4) Becker B.F., Duhm J. 1978. Evidence for anionic cation transport of lithium, sodium and potassium across the human erythrocyte membrane induced by divalent anions. *J. Physiol.* 282:149-168
- (5) Benos D.J. 1982. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am. J. Physiol.* 242:C131-C145
- (6) Biagi B., Kubota T., Shtell M., Giebisch G. 1981. Intracellular potentials in rabbit proximal tubule perfused in vitro. *Am. J. Physiol.* 240:F200-F210
- (7) Blatt M.R., Slayman C.L. 1983. KCl leakage from microelectrodes and its impact on the membrane parameters of a nonexcitable cell. *J. Membr. Biol.* 72: 223-234
- (8) Boron W.F., Boulpaep E.L. 1983. Intracellular pH Regulation in the Renal Proximal Tubule of the Salamander. Na-H Exchange. *J. Gen. Physiol.* 81:29-52
- (9) Boron W.F., Boulpaep E.L. 1983. Intracellular pH Regulation in the Renal Proximal Tubule of the Salamander. Basolateral HCO_3^- -Transport. *J. Gen. Physiol.* 81:53-94
- (10) Boron W.F., De Weer P. 1976. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2 , NH_3 , and metabolic inhibitors. *J. Gen. Physiol.* 67:91-112
- (11) Boron W.F., McCormick W.C., Roos A. 1981. pH regulation in barnacle muscle fibers: dependence on extracellular sodium and bicarbonate. *Am. J. Physiol.* 240:C80-C89
- (12) Boron W.F., Russel J.M. 1983. Stoichiometry and Ion Dependencies of the Intracellular-pH-regulating Mechanism in Squid Giant Axons. *J. Gen. Physiol.* 81:373-399
- (13) Boron W.F., Russel J.M., Brodwick M.S., Keifer D.W., Roos A. 1978. Influence of cyclic AMP on intracellular pH regulation and chloride fluxes in barnacle muscle fibres. *Nature* 276:511-513

- (14) Cabantchik Z.I., Knauf P.A., Rothstein A. 1978. The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane proteins evaluated by the use of 'probes'. *Biochim. Biophys. Acta* 515: 239-302
- (15) Cabantchik Z.I., Rothstein A. 1972. The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. *J. Membr. Biol.* 10:311-330
- (16) Callahan T.J., Goldstein D.A. 1978. Anion Inhibitor-Sensitive Unidirectional Sodium Movements in the Human Erythrocyte. *J. Gen. Physiol.* 72: 87- 100
- (17) Dubinsky W.P., Frizzell R.A. 1983. A novel effect of amiloride on H^+ -dependent Na^+ transport. *Am. J. Physiol.* 245: C157-C159
- (18) Duhm J., Becker B.F. 1977. Studies on the lithium transport across the red cell membrane. II. Characterization of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive Li^+ transport. Effects of bicarbonate and dipyrindamole. *Pflügers Archiv* 367:211-219
- (19) Ehrlich B.A., Diamond J.M. 1980. Lithium, membranes, and manic-depressive illness. *J. Membr. Biol.* 52:187-200
- (20) Fischbarg J., Lim J.J. 1974. Role of Cations, Anions and Carbonic Anhydrase in Fluid Transport across Rabbit Corneal Endothelium. *J. Physiol. (London)* 241:647-675
- (21) Fischer F., Voigt G., Liegl O., Wiederholt M. 1974. Effect of pH on Potential Difference and Short Circuit Current in the Isolated Human Cornea. *Pflügers Arch.* 349:119-131
- (22) Fromm M., Schultz S.G. 1981. Some properties of KCl-Filled Microelectrodes: Correlation of potassium 'leakage' with tip resistance. *J. Membr. Biol.* 62: 239-244
- (23) Frömter E., Gessner K. 1975. Effect of inhibitors and diuretics on electrical potential differences in rat kidney proximal tubule. *Pflügers Archiv* 357:209-224
- (24) Frömter E., Sato K. 1976. Electrical events in active H^+/HCO_3^- transport across rat kidney proximal tubular epithelium. In: *Gastric Hydrogen Ion Secretion*, pp. 382-403. Edited by Kasbekar D.K., Sachs G., Rehm W.S. Dekker, New York.
- (25) Frömter E., Sato K., Gessner K. 1976. Electrical Studies on the Mechanism of H^+/HCO_3^- Transport across Rat Kidney Proximal Tubule. *Proc. 6th int. Congr. Nephrol., Florence 1975*, pp. 108-112 (Karger, Basel 1976)
- (26) Frömter E., Ullrich K.J. 1980. Effect of inhibitors and the mechanism of anion transport in the proximal renal tubule of rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 341:97-110
- (27) Funder F., Tosteson D.C., Wieth J.O. 1978. Effects of bicarbonate on lithium transport in human red cells. *J. Gen. Physiol.* 71:721-746

- (28) Gospodarowicz D., Greenburg G., Birdwell C.R. 1978. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38:4155-4171
- (29) Gospodarowicz D., Mescher A.L., Birdwell C.R. 1977. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp. Eye Res.* 25: 75-89
- (30) Gospodarowicz D., Vlodavsky I., Savion N. 1981. The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells. *Vision Res.* 21:87-103
- (31) Green K., Simon S., Kelly G.M., Bowman K.A. 1981. Effects of $[Na^+]$, $[Cl^-]$, carbonic anhydrase, and intracellular pH on corneal endothelial bicarbonate transport. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 21:586-591
- (32) Greger R., Schlatter E. 1981. Presence of luminal K^+ , a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch.* 392:92-94
- (33) Guggino W.B., London R., Boulpaep E.L., Giebisch G. 1983. Chloride transport across the basolateral cell membrane of the Necturus proximal tubule: dependence on bicarbonate and sodium. *J. Membr. Biol.* 71:227-240
- (34) Gunther R.D., Wright E.M. 1983. Na^+ , Li^+ , and Cl^- Transport by Brush Border Membranes from Rabbit Jejunum. *J. Membr. Biol.* 74:85-94
- (35) Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C. 1977. Diffusion of Carbon Dioxide through Lipid Bilayer Membranes. *J. Gen. Physiol.* 69:779-794
- (36) Gutman Y., Hochman S., Wald H. 1973. The differential effect of Li^+ on microsomal ATPase in cortex, medulla and papilla of the rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 298:284-290
- (37) Hodson S. 1974. The regulation of corneal hydration by a salt pump requiring the presence of sodium and bicarbonate ions. *J. Physiol. (London)* 236: 271-302
- (38) Hodson S., Miller F. 1976. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. *J. Physiol. (London)* 263:563-577
- (39) Hodson S., Wigham C., Williams L., Mayes K.R., Graham M.V. 1981. Observations on the human cornea in vitro. *Exp. Eye Res.* 32:353-360
- (40) Huff J.W., Green K. 1981. Demonstration of active sodium transport across the isolated rabbit corneal endothelium. *Curr. Eye Res.* 1:113-114
- (41) Huff J.W., Green K. 1982. Ion Transport Systems in the Isolated Rabbit Corneal Endothelium. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 22 (Suppl.) (Abstract):101
- (42) Huff W.J., Green K. 1983. Characteristics of bicarbonate, sodium, and chloride fluxes in the rabbit corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 36:607-615

- (43) Hull D.S., Green K., Boyd M., Wynn H.R. 1977. Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability and fluxes and corneal thickness. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 16:883-892
- (44) Jennings M.L. 1976. Proton fluxes associated with erythrocyte membrane anion exchange. *J. Membr. Biol.* 28:187-205
- (45) Jentsch T.J., Keller S.K., Koch M., Wiederholt M. 1984 ?. Evidence for coupled electrogenic transport of bicarbonate and sodium in cultured bovine corneal endothelial cells. Submitted to *J. Membrane Biol.*
- (46) Jentsch T.J., Koch M., Bleckmann H., Wiederholt M. 1983. The Effect of Bicarbonate on the Intracellular Potential of Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 322: R10 (Abstract)
- (47) Jentsch T.J., Koch M., Bleckmann H., Wiederholt M. 1984. The effect of bicarbonate, pH, methazolamide and stilbenes on the intracellular potentials of cultured bovine corneal endothelial cells. *J. Membrane Biol.*, in press
- (48) Jumblatt M.M. 1981. Intracellular Potentials of Cultured Rabbit Corneal Endothelial Cells: Response to Temperature and Ouabain. *Vision Res.* 21:45-47
- (49) Kaye G.I., Cole J.D., Donn A. 1965. Electron microscopy: sodium localization in normal and ouabain-treated cells. *Science* 150:1167-1168
- (50) Kaye G.I., Tioe L.W. 1966. Studies on the cornea. V. Electron microscopic localization of adenosine triphosphatase activity in the rabbit cornea in relation to transport. *Invest. Ophthalmol.* 5:22-32
- (51) Kelly G., Green K. 1980. Influence of bicarbonate and CO₂ on rabbit corneal transendothelial bicarbonate fluxes. *Exp. Eye Res.* 30:641-648
- (52) Kim J.H., Green K., Martinez M., Paton D. 1971. Solute Permeability of the Corneal Endothelium and Descemet's Membrane. *Exp. Eye Res.* 12:231-238
- (53) Knauf P.A., Rothstein A. 1971. Chemical modification of membranes. I. Effect of sulphhydryl and amino reactive reagents on anion and cation permeability of the human red blood cell. *J. Gen. Physiol.* 58: 190- 210
- (54) Laprade R., Cardinal J. 1983. Liquid junctions and isolated proximal tubule transepithelial potentials. *Am. J. Physiol.* 244: F304-F319
- (55) Ledbetter S.R., Hatchel D.L., O'Brien W.J. 1983. Secondary aqueous humour stimulates the proliferation of cultured bovine corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24:557-562
- (56) Liebovitch L.S., Fischbarg J. 1982. Effects of inhibitors of passive Na⁺ and HCO₃⁻ fluxes on electrical potential and fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Curr. Eye Res.* 2:183-186

- (57) Lim J.J. 1981. Na^+ transport across the rabbit corneal endothelium. *Curr. Eye Res.* 1: 255-258
- (58) Lim J.J. 1982. Ion transport across the rabbit corneal endothelium. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 22(Suppl.) (Abstract):101
- (59) Lim J.J., Fischbarg J. 1979. Intra-cellular Potential of Rabbit Corneal Endothelial Cells. *Exp. Eye Res.* 28:619-626
- (60) Lim J.J., Fischbarg J. 1981. Electrical properties of rabbit corneal endothelium as determined from impedance measurements. *Biophys. J.* 36: 677-695
- (61) Lim J.J., Liebovitch L.S., Fischbarg J. 1983. Ionic selectivity of the paracellular shunt across the rabbit corneal endothelium. *J. Membr. Biol.* 73:95-102
- (62) Lim J.J., Ussing H.H. 1982. Analysis of Presteady-State Na^+ Fluxes across the Rabbit Corneal Endothelium. *J. Membrane Biol.* 65:197-204
- (63) Lönnerholm G. 1974. Carbonic Anhydrase in the Cornea. *Acta physiol. scand.* 90:143-152
- (64) Lowe A.G., Lambert A. 1983. Chloride-bicarbonate exchange and related transport processes. *Biochim. Biophys. Acta* 694: 353-374
- (65) Lütjen-Drecoll E., Lönnerholm G. 1981. Carbonic anhydrase distribution in the rabbit eye by light and electron microscopy. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21:782-797
- (66) MacCallum D.K., Lillie J.H., Scaletta L.J., Occhino J.C., Frederick W.G., Ledbetter S.R. 1982. Bovine Corneal Endothelium in vitro. *Exp. Cell Res.* 139:1-13
- (67) Maddy A.H. 1964. A fluorescent label for the outer components of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 88:390-399
- (68) Maren T.H. 1977. Use of inhibitors in physiological studies of carbonic anhydrase. *Am. J. Physiol.* 232: F291-F297
- (69) Maren T.H. 1980. Current status of membrane-bound carboanhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 341: 246-258
- (70) Mason R.J., Williams M.C., Widdicombe J.H., Sanders M.J., Misfeldt D.S., Berry L.C. 1982. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6033-6037
- (71) Moody W.J. 1981. The ionic mechanism of intracellular pH regulation in crayfish neurones. *J. Physiol. (London)* 316:293-308
- (72) Moolenaar W.H., Boonstra J., van der Saag P.T., de Laat S.W. 1981. Sodium/Proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 256:12883-12887

- (73) Nagel W. 1979. Inhibition of potassium conductance by barium in frog skin epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 552:346-357
- (74) Nelson D.J., Ehrenfeld J., Lindemann B. 1978. Volume changes and potential artifacts of epithelial cells of frog skin following impalement with microelectrodes filled with 3 M KCl. *J. Membrane Biol.* 40(special issue): 91-119
- (75) Paris S., Pouyssegur J. 1983. Biochemical Characterization of the amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport in chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258:3503-3508
- (76) Reinach P.S., Candia O.A., Siegel G.J. 1975. Lithium transport across isolated frog skin epithelium. *J. Membrane Biol.* 25:75-92
- (77) Riley M.V. 1977. Anion-sensitive ATPase in rabbit corneal endothelium and its relation to corneal hydration. *Exp. Eye Res.* 25:483-494
- (78) Riley M.V., Peters M.I. 1981. The localization of the anion-sensitive ATPase activity in corneal endothelium. *Biochim. Biophys. Acta* 644:251-256
- (79) Rindler M.J., Saier M.H. 1981. Evidence for Na^+/H^+ antiport in cultured dog kidney cells (MDCK). *J. Biol. Chem.* 256:10820-10825
- (80) Roos A., Boron W.F. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61:296-434
- (81) Russel J.M., Boron W.F. 1976. Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* 264:73-74
- (82) Russel J.M., Boron W.F., Brodwick M.S. 1983. Intracellular pH and Na fluxes in barnacle muscle with evidence for reversal of the ionic mechanism of intracellular pH regulation. *J. Gen. Physiol.* 82:47-78
- (83) Sabolic I., Burckhardt G. 1983. Apparent inhibition of Na^+/H^+ exchange by amiloride and harmaline in acridine orange studies. *Biochim. Biophys. Acta* 731: 354-360
- (84) Schulz I. 1971. Influence of Bicarbonate- CO_2 - and Glycodiazine Buffer on the Secretion of the Isolated Cat Pancreas. *Pflügers Arch.* 329:283-306
- (85) Smith T.C., Levinson C. 1975. Direct measurement of the membrane potential of Ehrlich Ascites tumor cells: Lack of effect of valinomycin and ouabain. *J. Membrane Biol.* 23: 349-365
- (86) Steels P.S., Boulpaep E.L. 1976. Effect of pH on ionic conductances at the proximal tubule epithelium of Necturus and the role of buffer permeability. *Fed. Proc.* 35:465 (Abstract)
- (87) Thomas R.C. 1976. Ionic mechanism of the H^+ pump in a snail neurone. *Nature* 262:54-55
- (88) Thomas R.C. 1976. The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. *J. Physiol. (London)* 255:715-735

- (89) Thomas R.C. 1977. The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. *J. Physiol. (London)* 273:317-338
- (90) Thomas R.C. 1980. Reversal of the pH_i -regulating system in a snail neuron. *Curr. Top. Membr. Transp.* 13: 23-29
- (91) Ullrich K.J., Capasso G., Rumrich G., Papavassiliou F., Klöss S. 1977. Coupling between proximal tubular transport processes. Studies with ouabain, SITS and HCO_3^- -free solutions. *Pflügers Archiv* 368:245-252
- (92) Ullrich K.J., Radtke H.W., Rumrich G., Klöss S. 1971. The Role of Bicarbonate and other Buffers on Isotonic Fluid Absorption in the Proximal Convolution of the Rat Kidney. *Pflügers Arch.* 330:149-161
- (93) Van Driessche W., Zeiske W. 1980. Ba^{2+} -Induced conductance fluctuations of spontaneously fluctuating K^+ channels in the apical membrane of frog skin (*Rana temporaria*). *J. Membr. Biol.* 56:31-42
- (94) Vaughan-Jones R.D. 1979. Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. *J. Physiol. (London)* 295:111-137
- (95) Vaughan-Jones R.D. 1982. Chloride-bicarbonate exchange in sheep cardiac Purkinje fibre. In: *Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions*. R. Nuccicelli and D.W. Deamer, editors. A.R. Liss, Inc., New York. 239-252
- (96) Whitehart D.R., Soppet D.R. 1981. Activities of transport enzymes located in the plasma membranes of corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 21:819-825
- (97) Wiederholt M., Koch M. 1978. Intracellular Potentials of Isolated Rabbit and Human Corneal Endothelium. *Exp. Eye Res.* 27:511-518
- (98) Wigham C., Hodson S. 1981. The effect of bicarbonate ion concentration on trans-endothelial short circuit current in ox corneas. *Curr. Eye Res.* 1:37-41
- (99) Wigham C., Hodson S. 1981. Bicarbonate and the transendothelial short circuit current of the human cornea. *Curr. Eye Res.* 1: 285-290

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Physiologie des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wiederholt durchgeführt, dem ich für seine Unterstützung ganz besonders herzlich danken möchte. Herrn Prof. Dr. Bleckmann danke ich für die Bereitstellung der Zellkulturen in dem Anfangsstadium der Experimente und für die Unterstützung beim eigenen Aufbau dieser Methode. Mein Dank gilt ebenfalls Frau Marianne Koch und Frau Astrid Krolik, die durch die Pflege der Zellkulturen, Anfertigen von Lösungen und Zeichnungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

- 24.4.1953 Geboren in Berlin-Hermsdorf
Eltern: Dr. Werner Jentsch, Diplomingenieur,
Dr. Gertraude Jentsch, Ärztin
- 1959-1965 Grundschulbesuch
- 1965-1972 Besuch der Bertha-von-Suttner-Oberschule in Berlin-Reinickendorf
- 18.1.1972 Abitur
- SS 1972 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- SS 1974 Beginn des Studiums der Physik an der Freien Universität Berlin
- 8.6.1976 Vordiplom in Physik
- 24.10.1978 Abschluss des Studiums der Medizin mit der Ärztlichen Prüfung
- 30.1.1979 Approbation als Arzt
- April 1979 Anfertigung der Diplomarbeit am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in der Abteilung Prof.Dr. Block mit dem Thema 'Untersuchungen zur Photoneninduzierten Feldionisation anhand der Systeme Xe/Cu, Äthylen/Cu, Äthylen/Ag'
- 16.6.1980 Diplomhauptprüfung in Physik
- 17.6.1980 Experimentelle Arbeiten zur physikalischen Dissertation am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft bei Prof. Dr. J. H. Block
- 2.1.1981
- 3.1.1981- Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Physiologie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Wierderholt
- 26.10.1982 Promotion zum Dr.rer.nat. am Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin mit der Arbeit 'Feldverdampfung und -desorption unter dem Einfluß von Laserbestrahlung'
- Nov. 1983 Abschluß der medizinischen Dissertationsarbeit

